

HUMBERTO ALVES DE OLIVEIRA

Estudo da regeneração simpática pós simpaticotomia  
seletiva experimental (ramicotomia)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Cirurgia Torácica e  
Cardiovascular  
Orientador: Prof. Dr. José Ribas Milanez de  
Campos

São Paulo

2008

# HUMBERTO ALVES DE OLIVEIRA

Estudo da regeneração simpática pós simpaticotomia  
seletiva experimental (ramicotomia)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Cirurgia Torácica e  
Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. José Ribas Milanez de  
Campos

São Paulo

2008

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu pai, que com toda sua simplicidade sempre foi um exemplo de sabedoria, honestidade e amizade.

Toda criança aprende o que vive e vive o que aprende.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda a minha vida.

À minha família, pelos exemplos que fundamentaram os meus conceitos morais e intelectuais.

Ao Prof. Dr. José Ribas Milanez de Campos, meu orientador, que sempre acreditou na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manoel Ximenes Netto, eterno incentivador da pesquisa científica, exemplo a ser seguido, pela sua dedicação e amizade, sempre disposto a ajudar nas horas mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Kleber Nogueira de Campos, grande responsável pela qualidade técnica desta pesquisa. Obrigado pela confiança e paciência.

Ao Prof. e Mestre José Belarmino Gama Filho, ávido pela pesquisa, nunca mediu esforços para disponibilizar toda a estrutura física e logística necessária para a realização dos experimentos.

Ao Dr. Paulo H C Carvalho, veterinário que participou de todos os experimentos e foi o responsável pela excelente anestesia nos animais, sem ele eu não teria realizado as operações.

Ao Dr. Flávio Brito Filho, amigo, parceiro de pesquisa e de trabalho, um braço forte e uma mente privilegiada, sempre disponível para ajudar.

Ao Dr. Elias C Almeida Filho por ter disponibilizado a estrutura do CETREX para realização dos experimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Luiza Capelozzi por abrir as portas de todos os laboratórios do Departamento de Patologia da USP para a realização das análises histológicas.

A meu grande amigo Dr. Edwin Roger Parra, pesquisador dedicado que, sempre de bom humor, me ensinou tudo que precisava para a realização das análises histológicas, meus mais profundos agradecimentos.

À Dr<sup>a</sup>. Weluma T A Souza, veterinária e técnica do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia, muito prestativa e alegre, confeccionou mais de 2.000 lâminas em tempo *record*, sem abrir mão da qualidade.

Às amigas Sandra de Moraes Fernezlian e Esmeralda Miristene Eher profissionais do laboratório de imuno-histoquímica.

À Profa. Walcy Teodoro Rosolina, pelo apoio nos estudos das fibras de colágeno e reticulares.

Aos meus colegas de trabalho que sempre me deram suporte durante a realização deste trabalho.

À minha querida noiva, Érica Nascimento Coelho, minha retaguarda nos momentos difíceis, sempre me apoiando apesar de minha ausência constante.

“ A vida é como jogar uma bola na parede:  
Se for jogada uma bola azul, ela voltará azul;  
Se for jogada uma bola verde, ela voltará verde;  
Se a bola for jogada fraca, ela voltará fraca;  
Se a bola for jogada com força, ela voltará com força.  
Por isso, nunca "jogue uma bola na vida" de forma  
que você não esteja pronto a recebê-la.  
A vida não dá nem empresta;  
não se comove nem se apieda.  
Tudo quanto ela faz é retribuir e transferir  
aquilo que nós lhe oferecemos.”

*Albert Einstein*

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

Lista de símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	8
2.1 ANATOMIA DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO.....	9
2.2 FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA DO SIST NERVOSO SIMPÁTICO	13
2.2.1 Termorregulação.....	14
2.2.2 Glândulas Sudoríparas.....	14
2.3 SIMPATECTOMIA TORÁCICA ENDOSCÓPICA.....	16
2.4 SIMPATICOTOMIA SELETIVA (RAMICOTOMIA).....	19
2.5 REGENERAÇÃO NEURAL.....	24
2.5.1 Degeneração Walleriana.....	25
2.5.2 Efeito Retrógrado da Lesão Axonal.....	26
2.5.3 Processo de Regeneração.....	27
<b>3 OBJETIVO</b> .....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS.....	34
4.2 BEM ESTAR ANIMAL.....	34
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS E RANDOMIZAÇÃO.....	35
4.4 ANESTESIA E REGIME VENTILATÓRIO.....	36
4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	37
4.6 EXTRAÇÃO DO SEGMENTO DA CADEIA SIMPÁTICA.....	39

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	42
4.7.1 Variáveis Histológicas Estudadas.....	43
4.7.1.1 Grau de Inflamação.....	43
4.7.1.2 Bainha de Mielina.....	43
4.7.1.3 Células de Schwann.....	43
4.7.1.4 Fibras de Colágeno.....	44
4.7.1.5 Fibras Reticulares.....	44
4.7.2 Fixação e Inclusão.....	44
4.7.3 Confeção das Lâminas e Padronização dos Cortes.....	45
4.7.4 Técnicas de Coloração Empregadas.....	47
4.7.4.1 Hematoxilina e Eosina.....	47
4.7.4.2 Picrossírius.....	48
4.7.4.3 Reticulina de Gomori.....	49
4.7.4.4 Weil.....	52
4.7.5 Procedimentos de Imunohistoquímica.....	53
4.7.5.1 Técnica de Silanização.....	54
4.7.5.2 Técnica de Imunohistoquímica Padrão.....	54
4.7.5.3 Marcação do Anticorpo S-100.....	55
4.7.6 Determinação das Marcações Imunohistoquímicas.....	55
4.7.7 Análise do Sistema Colágeno e Fibras Reticulares.....	56
4.7.8 Classificação do Infiltrado Inflamatório.....	58
4.8 Análise Estatística.....	61
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>



## LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

$\mu\text{m}$	Micrômetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbônico
DP	Desvio padrão
DPO	Dia de pós-operatório
EP	Erro padrão
F	French (unidade utilizada para definição de diâmetro 1 French = 0,33 mm)
Ghz	Gigahertz
Irpm	Incursões respiratórias por minuto
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
l/min	Litros por minuto
L1	Primeira vértebra lombar
L2	Segunda vértebra lombar
mcg/kg	Microgramas por kilograma
mg/kg	Miligrama por kilograma
min	Minutos
mM	Milimol
$p$	Probabilidade de erro alfa
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	O logaritmo negativo, para base 10, da concentração de íons livres de hidrogênio em uma solução.
P <sub>S-100</sub>	Quantidade de densidade das células de Schwann

r	Coeficiente de correlação linear de Pearson
$r_s$	Coeficiente de correlação linear de Spearman
seg	Segundos
SPSS	<i>Statistical Pachage for Social the Science</i>
STE	Simpatectomia Torácica Endoscópica
T1	Primeira costela torácica
T2	Segunda costela torácica
T3	Terceira costela torácica
T4	Quarta costela torácica
T5	Quinta costela torácica
T6	Sexta costela torácica
V	Volumes

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática dos neurônios simpáticos pré-ganglionares..... 11
- Figura 2 – Representação esquemática da distribuição dos neurônios pré e pós-ganglionares para os órgãos toraco-abdominais..... 12
- Figura 3 – Desenho ilustrando as glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas..... 15
- Figura 4 – Ilustração da simpatectomia endoscópica convencional para hiperidrose..... 17
- Figura 5 – Foto do tronco simpático demonstrando o bloqueio troncular por clipagem..... 18
- Figura 6 – Foto do tronco simpático em cadáver demonstrando os sítios da simpaticotomia seletiva (ramicotomia)..... 20
- Figura 7 – Desenho demonstrando o nervo de Kuntz e sua relação com o tronco simpático e ramos intercostais..... 23
- Figura 8 – Representação esquemática da relação anatômica entre os ramos comunicantes e os nervos intercostais..... 24
- Figura 9 – Desenho mostrando (A) secção dos ramos comunicantes pré e pós-ganglionares e (B) degeneração Walleriana proximal e distal à secção do axônio..... 28
- Figura 10 – Representação esquemática do processo de regeneração neural. A) formação dos prolongamentos de axônio do coto proximal e do cone de crescimento e B) formação da banda de Büngner que direciona os prolongamentos até o órgão alvo.... 30

- Figura 11 – Foto mostrando o tronco simpático elevado por um Hook e expondo os ramos comunicantes..... 38
- Figura 12 – Foto mostrando a secção dos ramos comunicantes com tesoura endoscópica posteriormente à cadeia simpática..... 39
- Figura 13 – Foto mostrando aderências pleuro-pulmonares cicatriciais em local do procedimento cirúrgico..... 40
- Figura 14 – Foto mostrando o bloco extraído com serra elétrica com margens de segurança..... 41
- Figura 15 – Foto mostrando a identificação da regeneração macroscópica dos ramos comunicantes..... 42
- Figura 16 – Fotos mostrando cortes corados com a coloração de picrossírius evidenciando as fibras de colágeno sob luz polarizada..... 49
- Figura 17 – Fotos mostrando ramos nervosos corados em tons cinza-escuro com a coloração de reticulina de Gomori..... 51
- Figura 18 – Fotos mostrando cortes corados pela coloração de Weil evidenciando os ramos brancos, ricos em mielina, corados em tons escuros e cinzentos, pobres em mielina, corados em tons claros..... 53
- Figura 19 – Fotos de cortes corados com HE mostrando: A e B – Ausência de reação inflamatória; C e D – Leve infiltrado inflamatório; E e F – Infiltrado inflamatório moderado; G e H – Extenso infiltrado inflamatório..... 59
- Figura 20 – Comparação entre as fibras de colágeno totais nos ramos comunicantes brancos e cinzentos nos grupos. Valores expressos em média  $\pm$  EP..... 65

Figura 21 – Comparação entre as fibras grossas de colágeno nos ramos comunicantes brancos e cinzentos. Valores expressos em média $\pm$ EP.....	66
Figura 22 – Comparação entre as fibras finas de colágeno nos ramos comunicantes brancos e cinzentos. Valores expressos em média $\pm$ EP.....	67
Figura 23 – Comparação entre fibras reticulares nos ramos comunicantes brancos e cinzentos. Valores expressos em média $\pm$ EP.....	68
Figura 24 – Comparação entre o total de fibras de colágeno e fibras reticulares nos diversos grupos. Valores expressos em média $\pm$ EP.....	69
Figura 25 – Comparação entre o total de fibras de colágeno e fibras reticulares nos diversos grupos. Valores expressos em média $\pm$ EP.....	69
Figura 26 – Comparação entre as células de Schwann nos ramos comunicantes brancos e cinzentos. Valores expressos em média $\pm$ EP.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da frequência de regeneração macroscópica nos grupos. Valores expressos em números de casos..... 65

Tabela 2 – Distribuição da frequência encontrada de reação inflamatória nos diversos grupos. Valores expressos em números de casos.... 71

## RESUMO

Oliveira HA. *Estudo da regeneração simpática pós simpaticotomia seletiva experimental (ramicotomia)*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

**INTRODUÇÃO:** A simpatectomia torácica é o único tratamento, definitivo e eficaz, para a hiperidrose primária. A ramicotomia é um procedimento cirúrgico tão eficaz, mais conservador e com menos efeitos adversos que a simpatectomia convencional, contudo foi abandonada pela alta taxa de recidiva, atribuída, até então, à secção incompleta dos ramos comunicantes, ao desenvolvimento de outras vias de condução para o estímulo central e à regeneração neural. A avaliação histológica dos ramos comunicantes simpáticos após a ramicotomia, pode ajudar a entender o processo de recidiva dos sintomas da hiperidrose e, dessa forma contribuir para o desenvolvimento de estratégias para evitá-la.

**MATERIAL E MÉTODOS:** 28 suínos foram submetidos à ramicotomia por videotoracoscopia e divididos randomicamente em 5 grupos, sacrificados com 15, 45, 90, 135 e 180 dias de pós-operatório (DPO). Os segmentos operados foram removidos cirurgicamente e submetidos à avaliação macroscópica da regeneração assim como análise histológica dos ramos comunicantes brancos e cinzentos para quantificação da reação inflamatória, deposição de fibras de colágeno grossas e finas, fibras reticulares e células de Schwann por imuno-histoquímica. Os dados foram comparados ao grupo controle, composto por segmentos intactos, não operados.

**RESULTADOS:** Não houve regeneração macroscópica no grupo de 15 DPO sendo presente em 41,6% dos casos no grupo 180 DPO ( $p < 0,05$ ). A reação inflamatória foi determinante no processo de degeneração Walleriana, com presença importante das células de Schwann nos ramos pré-ganglionares ( $p < 0,05$ ), as células de Schwann apresentaram evolução semelhante nos dois ramos a partir do grupo de 45DPO, mantendo-se em menor número nos ramos cinzentos. As fibras de colágeno foram cruciais na cicatrização e as fibras reticulares importantes na regeneração neural, com correlação negativa entre elas ( $r = - 0,414$ ;  $p < 0,01$ ). A deposição de fibras de colágeno foi maior nos ramos cinzentos, apresentando pico de deposição no grupo 135 DPO e declínio importante no grupo 180 DPO ( $p < 0,05$ ).

**CONCLUSÕES:** A ramicotomia permite a secção completa de todos os ramos comunicantes do gânglio simpático. A taxa de regeneração histológica deve ser maior que a taxa de recidiva dos sintomas no humano, devido a regenerações não funcionais. O processo regenerativo é similar nos ramos brancos e cinzentos, com tendências menores para os últimos. A regeneração dos ramos comunicantes deve ser um dos principais fatores de recidiva da hiperidrose após a ramicotomia.

**Descritores:** 1.Simpatectomia 2.Cirurgia torácica vídeo-assistida 3.Degeneração Walleriana 4.Células de Schwann 5.Suínos

## SUMMARY

Oliveira, HA. Study of sympathetic regeneration post *experimental selective sympathicotomy (ramicotomy)*. [thesis]. São Paulo: University of São Paulo, School of Medicine, 2008.

**INTRODUCTION:** Thoracic sympathectomy is the only definitive and efficient treatment for primary hyperhidrosis. The ramicotomy is a surgical procedure that is as efficient as conventional sympathectomy but more conservative, having less adverse effects than conventional sympathectomy. This procedure was abandoned on account of the high recurrence rate, attributed to the incomplete section of the rami communicantes and to the development of new pathways of conduction to the central stimuli.

**MATERIAL AND METHODS:** Twenty-eight swine underwent bilateral videothoroscopic ramicotomy and were randomly divided into 5 groups. The animals were sacrificed at 15, 45, 90, 135 and 180 days post-operative POD. The segments were removed and evaluated for macroscopic regeneration and histological analysis of the white and gray rami communicantes analyzing the inflammatory reaction, deposition of thin and thick collagen fibers, reticular fibers and Schwann cells. The data was compared to intact segments of sympathetic trunk as a positive control.

**RESULTS:** There was neither macroscopic nor microscopic regeneration at the 15 POD group. The remaining groups had an average of 41,6% of regeneration, more significant at the 180 POD group ( $p < 0.05$ ). The inflammatory reaction was crucial in the process of Wallerian degeneration, with an important participation of the Schwann cells in the pre-ganglionic rami ( $p < 0.05$ ). The Schwann cells presented a similar evolution in both rami beginning at the 45 POD group, with a smaller count in the gray rami. The collagen fibers were significant in the cicatrization and the reticular fibers were important in neural regeneration, with a meaningful negative correlation between them ( $r = - 0,414$ ;  $p < 0,01$ ). The rate of deposition of the collagen fibers was greater in the white rami when compared to the gray rami in the first trimester and less important in the second trimester ( $p < 0.05$ ).

**CONCLUSIONS:** Ramicotomy allows complete section of all rami communicantes of the sympathetic ganglia. The histological regeneration might be greater than the recurrence rates of clinical symptoms as seen in the human being due to non-functional regenerations. The restoration process is similar in both white and gray rami, with smaller tendencies in the last one. The regeneration of the could be one of the main factors for recurrence of hyperhidrosis following ramicotomy.

**Descriptors:** 1.Sympathectomy 2.Video assisted thoracic surgery 3.Wallerian degeneration 4.Schwann cells 5.Swine.





## 1 INTRODUÇÃO

A hiperidrose é uma condição clínica caracterizada por sudorese excessiva generalizada ou focal. O envolvimento generalizado costuma ocorrer devido a infecções, desordens endócrinas ou neurológicas, denominada de hiperidrose secundária; já o acometimento focal é idiopático e ocorre também em pessoas saudáveis, podendo afetar uma ou mais partes do corpo, mais frequentemente mãos, axilas, pés e face, nessa ordem. A hiperidrose acomete 1-2% da população, provocando distúrbios psico-sociais e interferindo nas atividades diárias dos pacientes <sup>1, 2</sup>. Entre as várias opções de tratamento, tópica, sistêmica, cirúrgicas e não cirúrgicas, a simpatectomia torácica é superior a qualquer outra modalidade de tratamento para o controle da hiperidrose primária palmar e axilar <sup>1, 3-6, 7</sup>. É cada vez maior o número de pacientes que se submetem a esse tipo de tratamento, bem como o número de cirurgiões que fazem o procedimento.

A primeira cirurgia de denervação simpática foi realizada em 1889 por *Alexander* tendo como único objetivo o tratamento de um paciente com epilepsia, sem nenhum intuito de reduzir a sudorese. A partir daí estendeu-se para vários outros casos como, bócio tóxico, dor pancreática intratável, exoftalmia, glaucoma e angina, a maioria com resultados pouco animadores, com exceção para as desordens vasoespásticas. A ressecção parcial do tronco simpático para abolir a hiperidrose só foi realizada em 1920 por Kotzareff <sup>8</sup>.

Várias técnicas têm sido utilizadas para a realização da simpatectomia torácica no tratamento da hiperidrose palmar e axilar, mas foi o advento da cirurgia minimamente invasiva na década de 90 que permitiu uma padronização do procedimento a nível mundial <sup>9</sup>. Atualmente a técnica mais difundida restringe-se à secção do tronco simpático ao nível das 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e/ou 4<sup>a</sup> costelas, dependendo da área acometida pela hiperidrose. Esse procedimento apresenta alta eficácia, chegando a 98-100% nas melhores séries. Dentre os vários efeitos indesejáveis provocados pela simpatectomia torácica, a sudorese compensatória é sem dúvida o mais prevalente e o que mais inibe os pacientes portadores da hiperidrose em se submeter ao tratamento, bem como a principal causa de insatisfação do paciente com resultado cirúrgico <sup>1, 2, 4, 6, 10-13</sup>. Geralmente acomete as regiões dorsal, tórax e abdome em 50-78% dos pacientes operados <sup>3, 7</sup>.

Muitos cirurgiões acreditam que os efeitos adversos ocasionados pelo bloqueio simpático estão diretamente relacionados ao bloqueio de outras vias que navegam pelo tronco não relacionadas ao dermatomo acometido pela hiperidrose. Tais vias seriam impedidas de promoverem seus efeitos nos órgãos alvo, necessários para o equilíbrio do sistema nervoso autônomo <sup>14, 15</sup>. A participação de outras vias ao nível do 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> gânglios torácicos é facilmente comprovada através da redução da frequência cardíaca encontrada durante o repouso, exercício sub-máximo e pico de exercício nos pacientes submetidos à simpatectomia torácica <sup>16-18</sup>.

Loewy demonstrou que as funções do sistema nervoso autônomo, similarmente ao sistema endócrino, são reguladas por mecanismos de

feedback positivo e negativo <sup>19</sup>. O centro regulador da transpiração localizado no hipotálamo envia um estímulo positivo aos órgãos alvo (glândulas sudoríparas), que por sua vez enviam um sinal negativo ao sistema nervoso central inibindo o estímulo do hipotálamo <sup>20, 21</sup>. A falta de estímulo por essas vias, após o bloqueio simpático resultante da simpatectomia, poderia exacerbar o feedback positivo do hipotálamo, que estimularia outros gânglios da cadeia simpática, desenvolvendo assim o suor reflexo <sup>15</sup>.

A evolução da técnica operatória tem demonstrado que quanto menor a área de denervação simpática (incluindo-se a preservação do segundo gânglio), menor a incidência e/ou a intensidade da sudorese compensatória, sem comprometimento da eficácia cirúrgica <sup>22, 23</sup>. Partindo dessa premissa, várias alternativas foram criadas na tentativa de diminuir a agressão ao tronco simpático e a conseqüente resposta compensatória do sistema nervoso autônomo. Vários estudos tentaram padronizar os níveis de abordagem dos gânglios simpáticos; sendo que para o rubor e hiperidrose facial direciona-se o bloqueio apenas para o nível da 2ª costela (T2); para o acometimento palmar o bloqueio de T3 e para o axilar apenas T4, atingindo-se assim o mesmo grau de satisfação com menor intensidade do suor reflexo <sup>10-12, 24, 25</sup>.

Várias estratégias foram utilizadas a fim de minimizar os efeitos adversos causados pela simpatectomia torácica, principalmente o suor reflexo. O bloqueio simpático com um clipe metálico é uma boa opção cirúrgica, pois possibilita a reversão da cirurgia nos casos de suor reflexo

severo, contudo apresenta sucesso na reversão em aproximadamente 50% dos casos, além de manter o bloqueio das outras vias que navegam pelo tronco simpático<sup>26, 27</sup>.

Com o intuito de utilizar um procedimento cirúrgico menos agressivo, para produzir os mesmos efeitos positivos da simpatectomia convencional e ao mesmo tempo causar o menor desequilíbrio possível ao sistema nervoso autônomo, foi criada a simpaticotomia seletiva, ou ramicotomia, focalizando o bloqueio simpático apenas ao dermatomo acometido pela hiperidrose e liberando o trajeto troncular para as outras vias não relacionadas às glândulas sudoríparas.

Esse procedimento alternativo mais conservador foi descrito pela primeira vez por Wittmoser em 1992 e posteriormente adotado por Gossot e Lee, o qual consiste em preservar a comunicação interganglionar no tronco simpático, abordando apenas os ramos comunicantes<sup>5, 28, 29</sup>. A simpaticotomia seletiva, ou ramicotomia, realizada ao nível do 2º, 3º e 4º gânglios apresentou eficácia semelhante à simpatectomia convencional, contudo, criou outro inconveniente importante, a alta taxa de recidiva da hiperidrose. Devido à impossibilidade de examinar histologicamente o sítio cirúrgico no pós-operatório em pacientes humanos e ao mito da não regeneração neural entre a maioria dos cirurgiões, o índice de 20%, em média, de retorno dos sintomas simpáticos foi atribuído principalmente à falta de secção de todos os ramos comunicantes para gânglio operado, bem como ao desenvolvimento de outras vias de condução pelo sistema nervoso central<sup>4, 6, 30, 31-33</sup>.

No entanto, a literatura mostra bem claramente que vários pesquisadores comprovaram a existência de restauração de tecido do sistema nervoso periférico, tanto motor quanto autônomo, que pode ser por cicatrização, ou seja, substituição do tecido nervoso por fibras de colágeno, ou regeneração, que por sua vez pode ser funcional ou não. Também definiram parâmetros importantes que favorecem a regeneração neural, como a proximidade dos cotos axonais seccionados e o tempo gasto na reaproximação destes após a lesão<sup>34-36</sup>.

As estruturas anatômicas da cadeia simpática torácica são muito delgadas e a distância entre elas é geralmente milimétrica, ao realizar a ramicotomia, produz-se uma secção no axônio distal muito próxima do gânglio simpático, dessa forma o coto distal à lesão, segmento em que ocorrerá degeneração completa, é muito curto, isso poderia permitir uma regeneração completa em curto espaço de tempo, quando comparado à secção do tronco simpático, como ocorre na simpatectomia convencional.

Outra característica após a ramicotomia é a aproximação natural e imediata dos ramos comunicantes seccionados, pois o tronco preservado retorna à sua posição original após o procedimento, favorecendo assim a reconexão entre eles.

A avaliação morfométrica dos ramos comunicantes, em diferentes etapas no pós-operatório da ramicotomia, poderia identificar aspectos temporais, bem como indicadores histológicos do processo de cicatrização e regeneração neural. A confirmação da existência dessa reconexão poderia estimular a criação de mecanismos para evitá-la e assim reativar a prática

de um procedimento mais conservador, que preserva a integridade do tronco simpático, no tratamento da hiperidrose primária.





## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 ANATOMIA DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO**

Os primeiros relatos anatômicos do sistema nervoso autônomo iniciaram em meados do século II com Claudius Galenus, o qual acreditava tratar-se de um único sistema, denominado tronco vago-simpático, originando-se no tronco cerebral. Essa idéia permaneceu até 1563, quando Eustachius demonstrou que o vago e simpático eram nervos separados, contudo a estrutura anatômica desses nervos só foi melhor esclarecida no século XIX com o advento da histologia <sup>37</sup>.

A evolução dos estudos histológicos e eletro-fisiológicos demonstrou que as regiões cerebrais envolvidas no controle do sistema simpático estão distribuídas no tronco cerebral, diencéfalo e córtex. As informações partem das áreas corticais altas, incluindo ínsula, cíngulo anterior, amígdala e córtex pré-frontal ventro-medial, atingindo os centros autonômicos no diencéfalo e tronco cerebral. O neurônio pré-ganglionar na medula espinhal é diretamente controlado pela região ventrolateral da medula, substância cinzenta periaquedutal, núcleo parabraquial e hipotálamo. O arranjo das fibras na medula ventrolateral é provavelmente topográfico; elas descem pelos fascículos longitudinal, dorsal e espinovestibular, onde fazem sinapse com o segundo neurônio pré-ganglionar, localizado na coluna intermédio-lateral da medula do primeiro

segmento medular torácico (T1) até o segundo lombar (L2). Cada segmento medular contém aproximadamente 5.000 neurônios pré-ganglionares<sup>38, 39</sup>.

Os neurônios pré-ganglionares deixam a substância cinzenta da medula, no corno intermédio-lateral de T1 a L2, pelas raízes ventrais dos nervos espinhais e penetram na cadeia simpática paravertebral lateralmente, através dos ramos comunicantes brancos, assim chamados por serem ricos em mielina. As fibras podem fazer sinapses com o neurônio pós-ganglionar no gânglio correspondente, subir ou descer através dos ramos interganglionares fazendo sinapses em gânglios situados superior, ou inferiormente, ou ainda atravessar a cadeia ganglionar e fazer sinapses nos gânglios pré-vertebrais, como ocorre com os nervos esplâncnicos (Figura 1)<sup>40, 41</sup>. Essas fibras pós-ganglionares inervam as vísceras pélvicas e abdominais; a única exceção é a medula adrenal, que recebe fibras pré-ganglionares diretamente, onde suas células secretoras de adrenalina funcionam como fibras pós-ganglionares modificadas<sup>39, 42</sup>. Cada axônio pré-ganglionar inerva aproximadamente dez neurônios pós-ganglionares, o que ajuda na atuação difusa do sistema simpático.

As fibras pós-ganglionares que constituem os ramos cinzentos deixam os gânglios paravertebrais medialmente e atingem os órgãos alvo na cabeça, tronco, membros e órgãos torácicos.

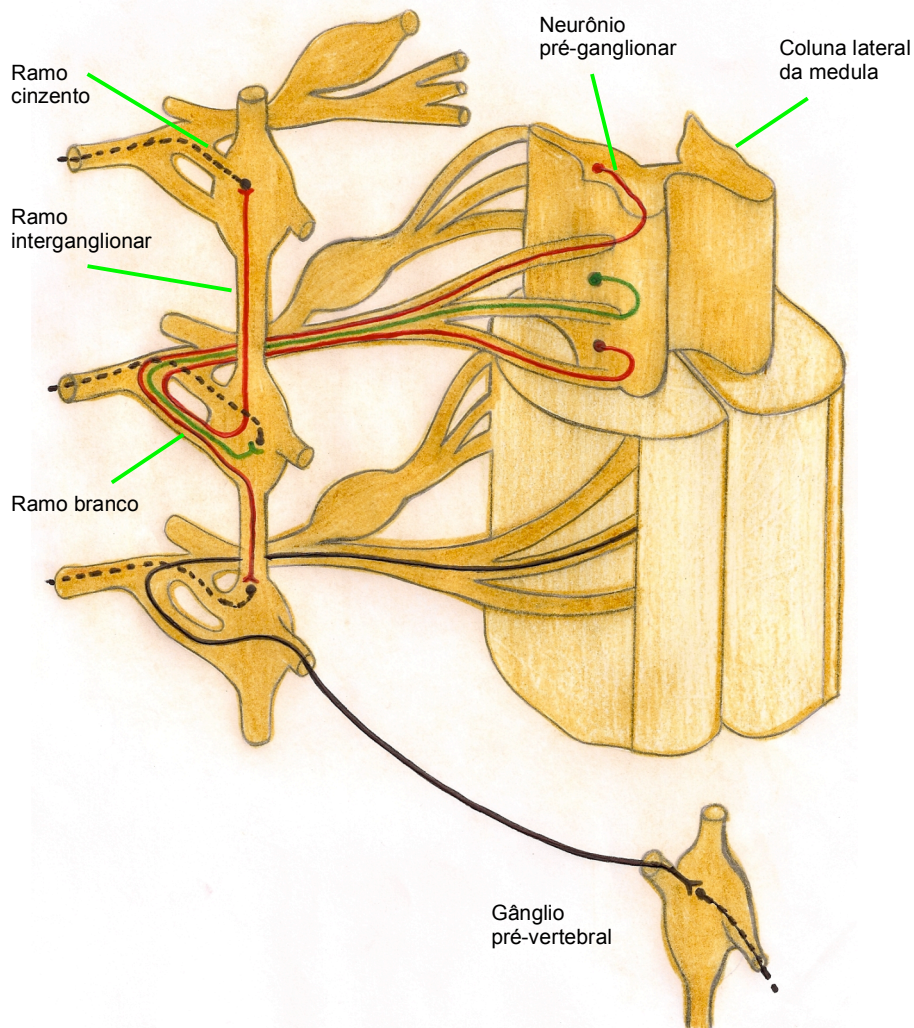


Figura 1 – Representação esquemática dos neurônios simpáticos pré-ganglionares.

Há também outro aspecto importante na distribuição das fibras pré-ganglionares; a inervação das regiões da cabeça e do pescoço origina-se geralmente dos segmentos espinhais de T1 a T3, e passam pelos ramos comunicantes brancos para os gânglios cervicais, enquanto as fibras para os membros superiores e axila originam-se nos segmentos T3 a T6, sobem pelo tronco simpático até o plexo braquial e atingem os dermatômos correspondentes (Figura 2) <sup>38</sup>.

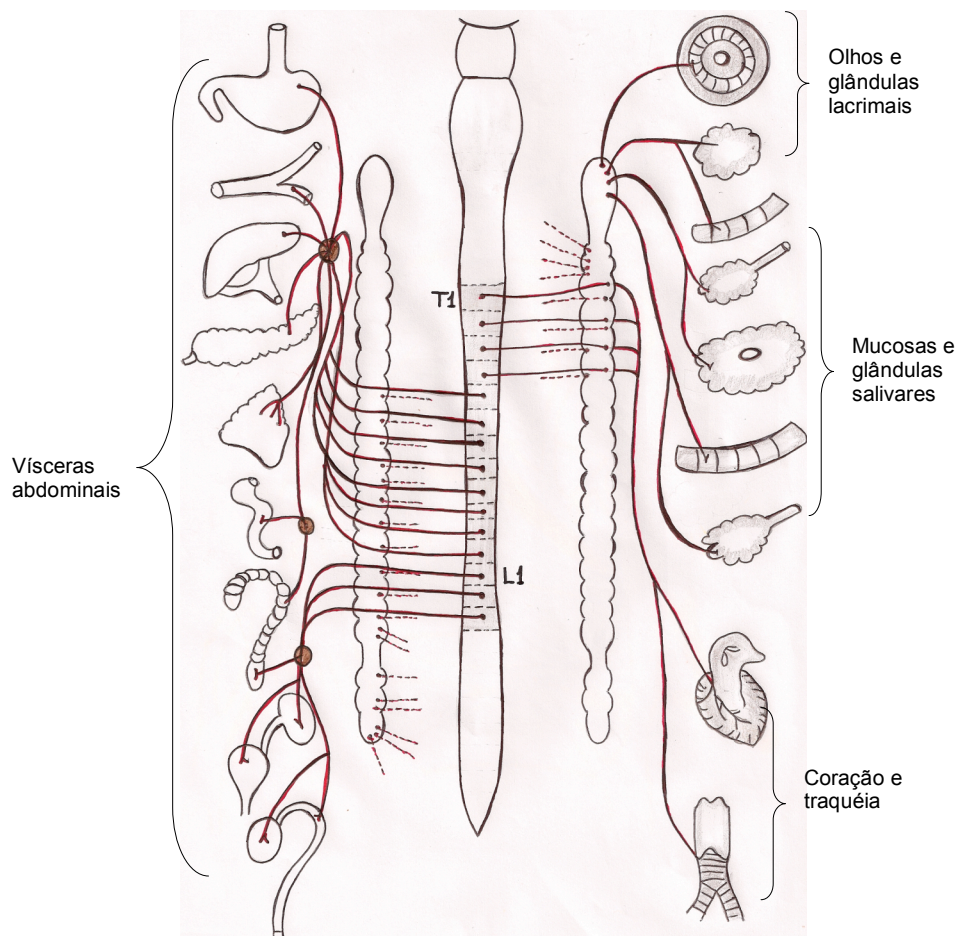


Figura 2 – Representação esquemática da distribuição dos neurônios pré e pós-ganglionares para os órgãos toraco-abdominais.

Os troncos simpáticos paravertebrais são formados por uma cadeia ganglionar bilateral, situada ao longo de toda a extensão da coluna vertebral, mantendo conexões com a medula espinhal torácica e lombar alta por meio dos ramos comunicantes brancos. Cada cadeia é composta por três gânglios cervicais, 12 torácicos, dois a cinco lombares, quatro ou cinco sacrais e um coccígeo, gânglio ímpar, para o qual convergem e onde terminam as cadeias simpáticas<sup>38</sup>.

## 2.2 FISILOGIA E FARMACOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO

Os primeiros passos para o entendimento da fisiologia do sistema simpático foram dados por Claude Bernard em 1852, que observou uma dilatação dos vasos sanguíneos da orelha de um coelho após a secção do tronco simpático cervical. No mesmo ano, Brown-Séguar estimuló eletricamente o tronco simpático cervical de um coelho e notou o efeito inverso descrito por Bernard. Em 1915 Charles Gruber comparou o efeito do estímulo elétrico sobre o tronco simpático cervical e o nervo corda do tímpano na vasodilatação e secreção salivar<sup>40, 43-45</sup>.

A aplicação de novas técnicas de eletrofisiologia e farmacologia permitiram identificar que o principal neurotransmissor utilizado pelos neurônios pré-ganglionares na via aferente é a acetilcolina. Em contrapartida os neurônios pós-ganglionares utilizam principalmente a noradrenalina para a transmissão do impulso nervoso, exceto as fibras sudomotores que liberam principalmente acetilcolina. O controle da transmissão do sinal elétrico na fenda sináptica é modulado por vários outros neuropeptídeos excitatórios ou inibitórios de função ainda pouco conhecidos.

As fibras simpáticas pós-ganglionares para os membros podem ser divididas em três classes funcionais: inervação vasocostritora que controla o suprimento sanguíneo para os músculos, inervação sudomotora específica para alvos na pele, em especial as glândulas sudoríparas e fibras pilomotoras que atuam no folículo piloso. A ação em conjunto dos três tipos

de fibras simpáticas é um dos principais mecanismos de regulação da temperatura corporal, em especial a ação sobre as glândulas sudoríparas.

### 2.2.1 Termorregulação

A temperatura corporal é mantida em torno de 36 °C através da ação do centro termorregulador do hipotálamo, o qual envia impulsos através das vias simpáticas a vários órgãos efetores promovendo vasodilatação, piloereção e sudorese. O suor pode ocorrer, além do estímulo térmico, em resposta a alimentos condimentados, ansiedade e estresse <sup>46</sup>.

A taxa de sudação aumenta de acordo com o aumento da temperatura corporal. Geralmente a sudorese ocorre durante o repouso apenas em temperaturas externas superiores a 24 °C e quase nunca em temperaturas inferiores a 18 °C <sup>46</sup>.

### 2.2.2 Glândulas Sudoríparas

Existem dois tipos de glândulas sudoríparas: apócrinas e écrinas. As glândulas apócrinas estão mais concentradas nas axilas e localizadas mais profundamente na derme. Embora tenham um tamanho 10 vezes maior que as glândulas écrinas, secretam em uma quantidade muito menor, um produto com aspecto leitoso, rico em gordura e colestérina. Essas glândulas não possuem inervação que estimule diretamente a secreção e se exteriorizam sempre em folículos pilosos (Figura 3). Essas glândulas não são responsáveis pela hiperidrose, mas sim pelo odor desagradável do suor

nos casos de bromidrose, devido à decomposição e fermentação bacteriana do produto excretado. Geralmente se desenvolvem apenas na puberdade.

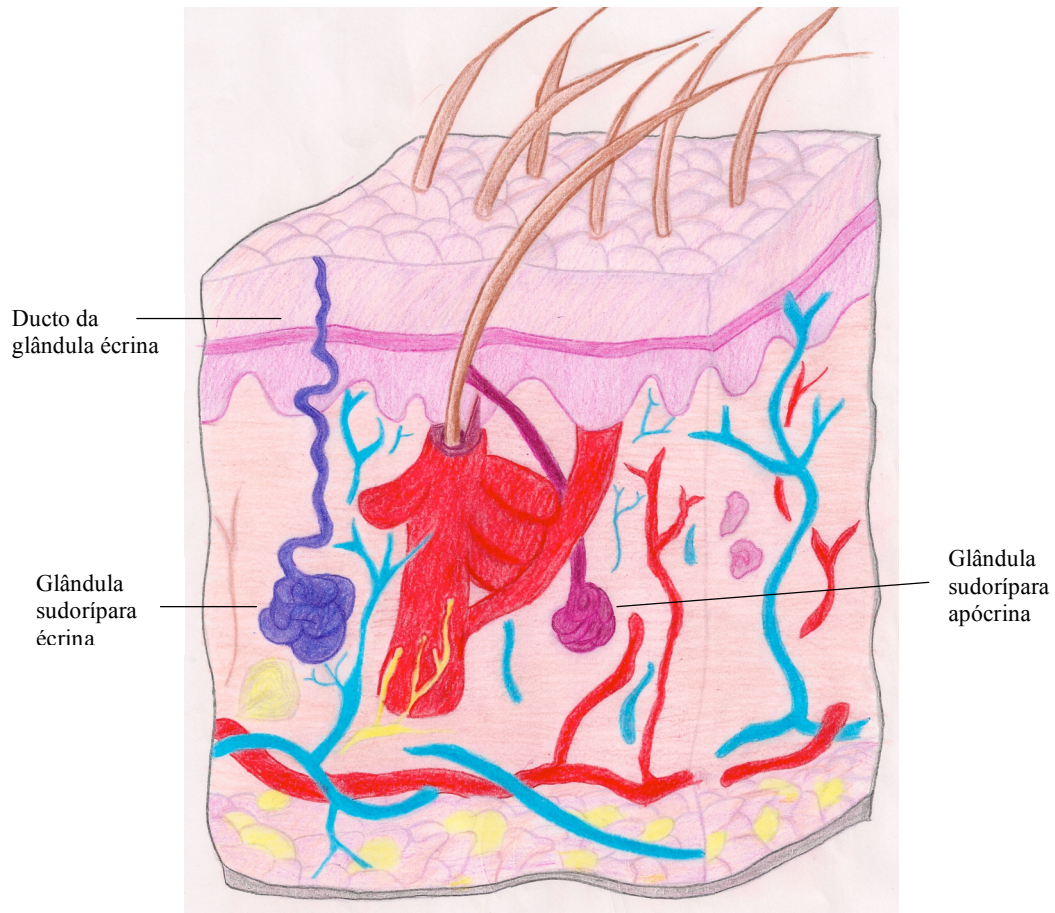


Figura 3 – Desenho ilustrando as glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas.

Ao contrário das glândulas apócrinas, as écrinas se caracterizam por eliminarem apenas o produto da secreção de suas células, uma mistura hipotônica, levemente ácida, contendo sódio, potássio, uréia, aminoácidos, enzimas, compostos orgânicos e metais pesados. São inervadas por fibras colinérgicas do sistema simpático e, em situações extremas, podem produzir até oito litros de suor em 24 horas <sup>46</sup>.

### 2.3 SIMPATECTOMIA TORÁCICA ENDOSCÓPICA

O aumento da secreção das glândulas écrinas, além do necessário para o resfriamento do corpo, caracteriza um distúrbio denominado de hiperidrose e o principal tratamento cirúrgico definitivo é a simpatectomia torácica endoscópica (STE).

A simpatectomia para hiperidrose palmar, axilar e facial tem a finalidade de bloquear o estímulo transmitido pelo neurônio pós-ganglionar no tronco simpático ao dermatomo correspondente. Apresenta altos índices de eficácia (98-100%) tendo a sudorese compensatória como principal efeito adverso. Nessa condição o paciente passa a transpirar em excesso em outras regiões do corpo após a cirurgia, principalmente em resposta a estímulos térmicos e ao esforço físico. As regiões mais acometidas são o dorso, abdome, coxas e virilhas, nessa ordem <sup>47, 48</sup>.

A técnica utilizada inicialmente consistia em retirar a cadeia simpática da 2ª até a 5ª costelas, com o intuito de abranger toda a área de interesse e evitar a regeneração do tronco (Figura 4), Smithwick em 1940 sugeria inclusive uma sutura invertendo o coto remanescente para impedir a reconexão do nervo <sup>49</sup>. Esse procedimento exigia maior tempo operatório com maior morbidade e alto índice de suor reflexo.

Com a popularização da simpatectomia, a preocupação com a sudorese compensatória tornou-se constante e alguns autores criaram questionários para avaliar a qualidade de vida antes e após a cirurgia para



hiperidrose na tentativa de padronizar um procedimento que apresentasse o máximo efeito com o mínimo de suor reflexo <sup>13, 50</sup>.

Gossot em 2003 avaliou os resultados tardios de pacientes simpatectomizados com até sete anos de seguimento e demonstrou que a sudorese compensatória não aumenta com o tempo, mas que a ressecção do 2º ao 4º gânglios provocava um suor reflexo importante em 31,5% e incapacitante em 7,5% dos pacientes <sup>4</sup>.

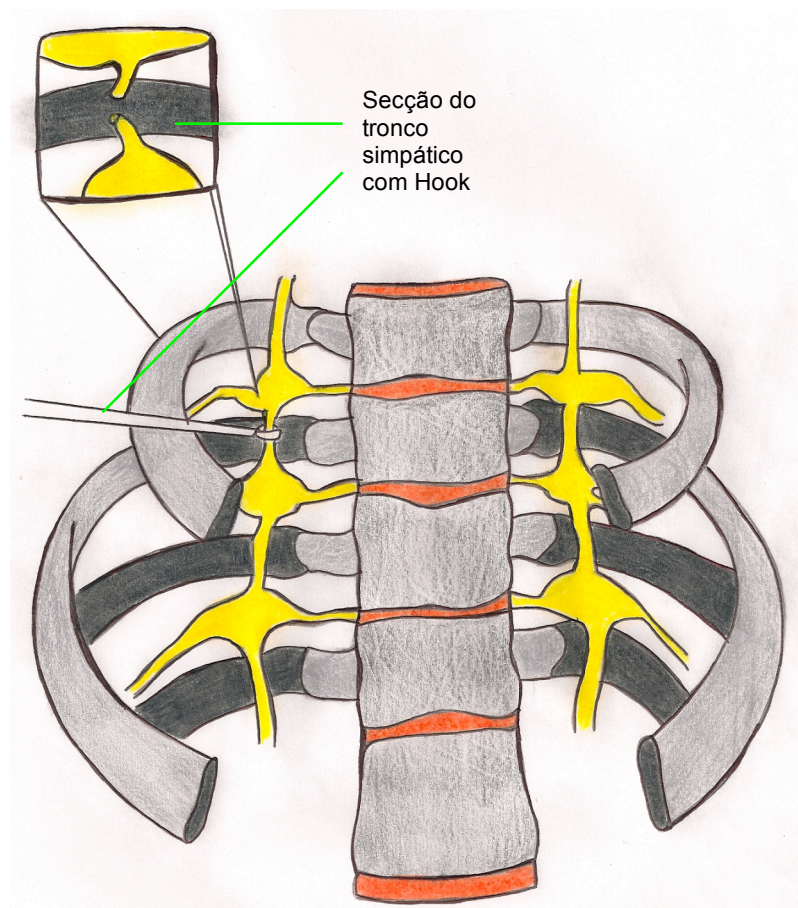


Figura 4 – Ilustração da simpatectomia endoscópica convencional para hiperidrose.

Vários estudos subseqüentes estabeleceram uma relação entre a localização da hiperidrose primária e o gânglio responsável pelo estímulo simpático. O segundo gânglio seria o responsável pela hiperidrose e rubor facial, o terceiro e quarto gânglios pela hiperidrose palmar e axilar respectivamente <sup>11, 51-53</sup>. Desta forma, ao analisar os diferentes níveis de ressecção da cadeia simpática, verificou-se que a abordagem em níveis inferiores ao segundo gânglio apresentou significativa redução da sudorese compensatória <sup>10, 11, 24</sup>.

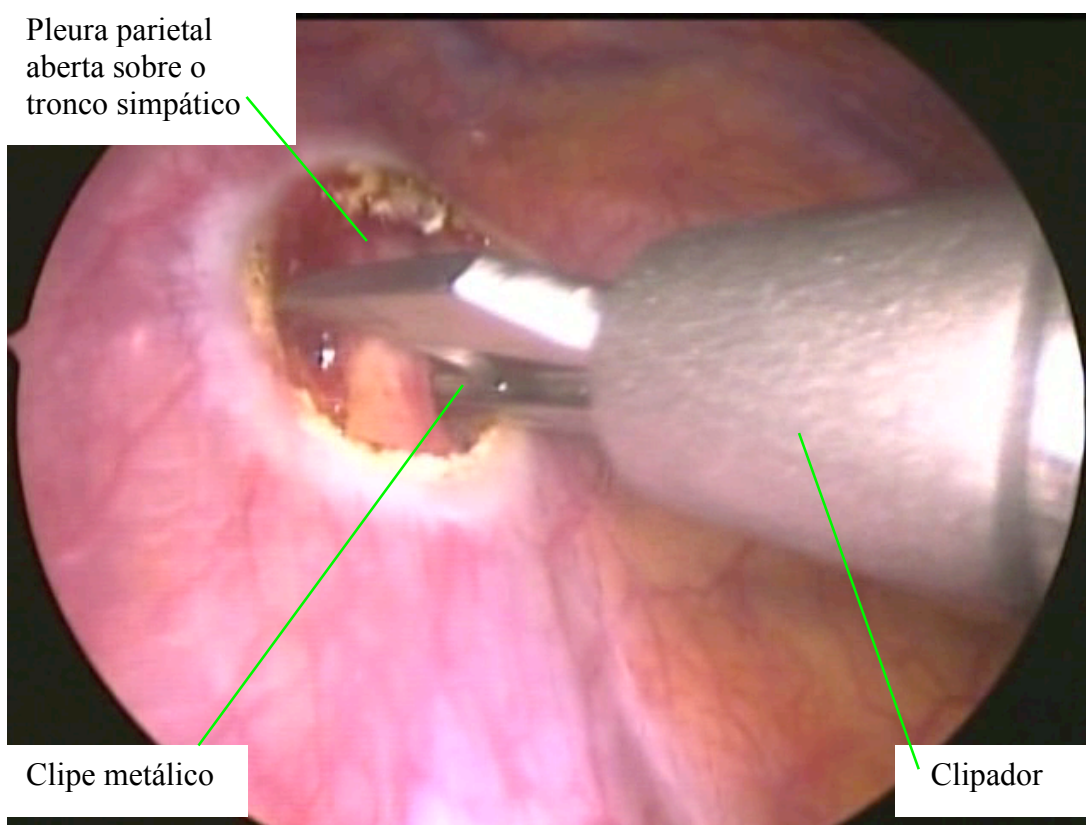


Figura 5 – Foto do tronco simpático demonstrando o bloqueio troncular por clipagem.

Alguns autores acreditam que a porção anterior do hipotálamo recebe informações térmicas aferentes de receptores centrais e periféricos e envia sinais eferentes às glândulas sudoríparas. Esses receptores periféricos estariam presentes principalmente ao nível do 2º e 3º gânglios torácicos, assim, após a simpatectomia em T2-3, o “feedback” negativo seria bloqueado, o que poderia induzir a hiper-estimulação de outras áreas levando ao suor reflexo<sup>14, 52</sup>. Em certos casos, a intensidade da sudorese chega a ser fator limitante da qualidade de vida no pós-operatório. Por esse motivo, alguns cirurgiões advogam a técnica de clipagem do tronco simpático promovendo o bloqueio do impulso nervoso, com a mesma eficácia do procedimento convencional, porém com a possibilidade de reverter a cirurgia nos casos de insatisfação por parte do paciente (Figura 5)<sup>54-59</sup>. O mecanismo exato da sudorese compensatória permanece inexplicado e, apesar da alta incidência, até o momento não foi descrita uma maneira efetiva de evitá-la<sup>60, 61</sup>.

#### 2.4 SIMPATICOTOMIA SELETIVA (RAMICOTOMIA)

A preocupação com a sudorese compensatória após o procedimento de simpatectomia convencional, através do bloqueio do impulso nervoso no tronco simpático, seja por secção ou clipagem, estimulou a criação de um procedimento alternativo mais fisiológico e conservador. Descrito pela primeira vez por Wittmoser em 1992 e posteriormente adotado por Gossot e Lee, a simpaticotomia seletiva, ou

ramicotomia, consiste em preservar a comunicação interganglionar no tronco simpático, abordando apenas os ramos comunicantes (Figura 6). Dessa forma, são preservadas as outras vias simpáticas que viajam pela cadeia paravertebral até atingir os órgãos alvo, como, por exemplo, o coração, a traquéia e as glândulas salivares <sup>5, 28, 29</sup>.

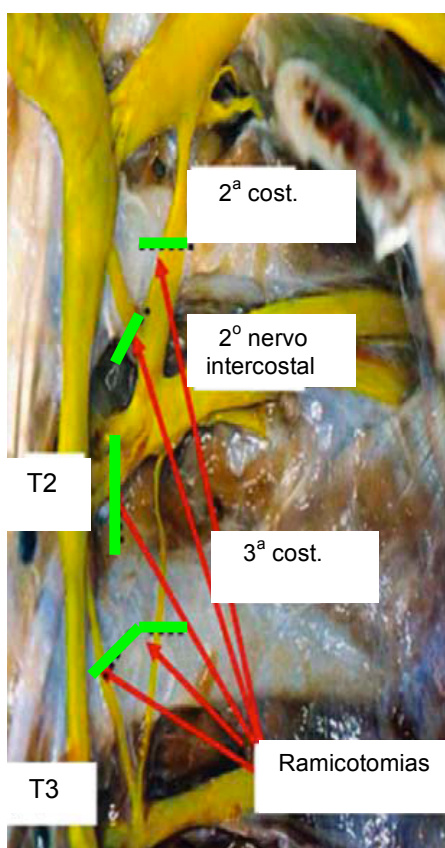


Figura 6 – Foto do tronco simpático em cadáver demonstrando os sítios da simpaticotomia seletiva (ramicotomia). FONTE: DH Kim et al. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2004; 26:396-400.

Alguns estudos comparando a simpatectomia convencional com a simpaticotomia seletiva dos ramos comunicantes do 2º gânglio torácico, para hiperidrose craniofacial, e do 3º e 4º gânglios, para hiperidrose palmar e

axilar, mostraram a mesma eficácia para anidrose e uma significativa redução na incidência e intensidade do suor reflexo, promovendo maior grau de satisfação dos pacientes <sup>6, 31-33</sup>. Infelizmente, o acompanhamento pós-operatório desses pacientes mostrou alta taxa de recidiva da hiperidrose, 5% a 20%, sendo a técnica abandonada pela maioria dos serviços <sup>4, 28, 62</sup>.

Entre as hipóteses que explicam o retorno dos sintomas estão: secção incompleta dos ramos comunicantes, devido à maior dificuldade técnica do procedimento; transmissão do impulso nervoso por outra via anatômica pré-existente, ou a regeneração do nervo <sup>30</sup>.

Um aspecto importante é o papel que cada ramo neural desempenha no processo de hiperidrose palmar e axilar. O ramo comunicante pré-ganglionar (branco), constituído por fibras ricas em mielina, é o responsável pela transmissão do estímulo central ao gânglio simpático, portanto, sua secção deve ser o objetivo primário na ramicotomia, principalmente nos casos de hiperidrose palmar, nos quais os ramos pós-ganglionares estão localizados no plexo braquial, não acessíveis cirurgicamente. Já o ramo comunicante pós-ganglionar (cinzento), constituído por fibras pobres em mielina, é o responsável pela inervação do dermatomo; sendo assim, sua importância cirúrgica se faz para os casos de hiperidrose axilar, onde apenas sua secção ao nível do terceiro gânglio seria suficiente para o sucesso do tratamento <sup>38, 39</sup>.

#### 2.4.1 Variação Anatômica dos Ramos Comunicantes da Cadeia Simpática

A localização e as conexões dos ramos comunicantes do tronco simpático torácico superior apresentam variações pouco documentadas. Essas alterações podem ser cruciais para o entendimento de parte dos insucessos cirúrgicos ou da recidiva dos sintomas após a simpatectomia convencional e principalmente, após os procedimentos conservadores da cadeia simpática no tratamento da hiperidrose primária.

O neuroanatomista Albert Kuntz, em 1927, foi o primeiro a descrever a presença de ramos comunicantes adicionais que conectam o segundo nervo intercostal ao primeiro nervo torácico, localizado de 2.3mm a 15.7mm lateral ao segundo gânglio torácico nos adultos, sem passar pela cadeia simpática (Figura 7). Kuntz atribuiu a recorrência simpática, após a ganglionectomia cervico-torácica realizada em sua época, à presença de ramos acessórios que conectavam o segundo gânglio ao plexo braquial sem passar pelo tronco simpático, seria um caminho alternativo para o impulso neural. Posteriormente foram identificados outros ramos acessórios comunicando, não somente o primeiro e segundo gânglios, mas também o terceiro e quarto gânglios torácicos. A todos esses nervos aberrantes foram aplicados o mesmo epônimo, nervo de Kuntz<sup>8, 63, 64</sup>.

Ramsaroop em 2001 comparou a literatura existente com seus achados de microdissecção em cadáveres de fetos e adultos e encontrou uma variação importante na incidência das alterações anatômicas dos ramos comunicantes. A presença mais freqüente é, sem dúvida, a do nervo de Kuntz, no primeiro espaço intercostal, de 38% a 75%. Para os ramos

adicionais no segundo espaço intercostal a incidência varia de zero a 58%, diminuindo à medida que se afasta do gânglio estrelado<sup>64</sup>.

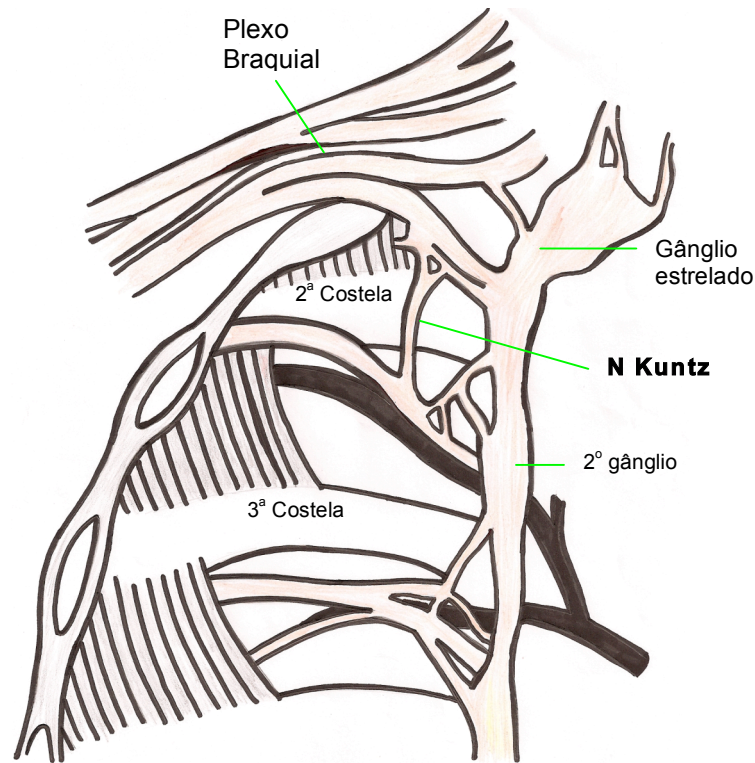


Figura 7 – Desenho demonstrando o nervo de Kuntz e sua relação com o tronco simpático e ramos intercostais.

Recentemente, Cho em 2005 avaliou os ramos comunicantes do segundo, terceiro e quarto gânglios torácicos, através de videotoroscopia imediatamente antes da realização de simpaticotomia seletiva. Ele encontrou ramos que ascendem ou descendem do segundo ao quarto gânglios torácicos para os nervos intercostais vizinhos na proporção de 66.7%, 32.1% e 13.1%, respectivamente (Figura 8). Por isso, vários autores acreditam que a falha cirúrgica, a alta recidiva da hiperidrose e o suor assimétrico após os

procedimentos de ramicotomia podem ser devidos à presença dessas variações anatômicas<sup>65, 66</sup>.

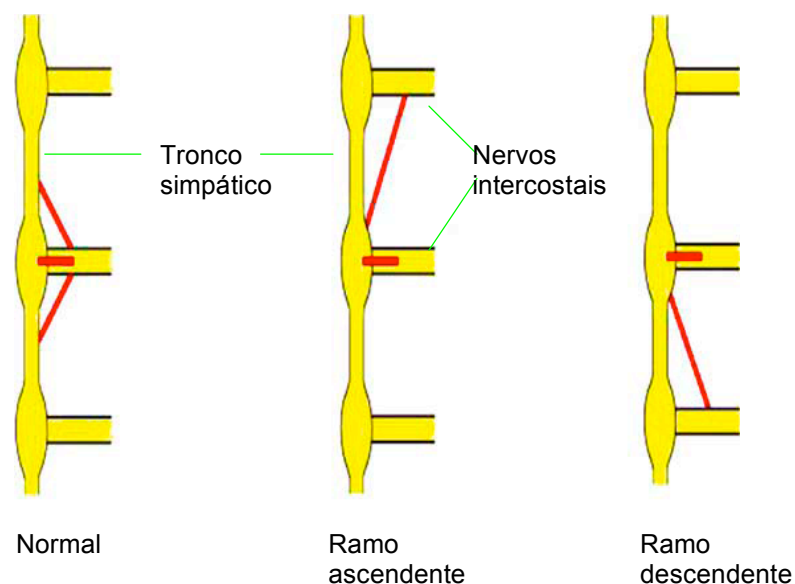


Figura 8 – Representação esquemática da relação anatômica entre os ramos comunicantes e os nervos intercostais.

## 2.5 REGENERAÇÃO NEURAL

Os neurônios se distinguem entre as células do corpo humano pelo número e variedade dos seus processos axonal e dendríticos. Considerável atenção é dada às relações tróficas entre o corpo celular, ou pericário, e seu axônio, bem como às conseqüências da lesão neuronal. Em 1850 o fisiologista inglês Augustus Volney Waller afirmou que quando o axônio é seccionado, o segmento distal invariavelmente degenera. Entretanto, não é apenas nesta parte do axônio que as alterações degenerativas ocorrem. Alterações comparativamente graves podem ser observadas no pericário de



muitos neurônios. Em vários sistemas neuronais uma atrofia, ou mesmo degeneração, também pode ser observada nos neurônios que estão relacionados sinapticamente às células nervosas lesadas <sup>67</sup>. Este paralelismo suporta a hipótese que um suprimento retrógrado de fatores tróficos do órgão alvo ou das células gliais ao longo do axônio é necessário para assegurar a sobrevivência e manutenção metabólica do neurônio <sup>34</sup>. Simultaneamente ao processo de degeneração distal após a axoniotomia, inicia-se um processo de regeneração neural a partir do segmento proximal que muitas vezes logra sucesso.

Ainda no século XIX o potencial de regeneração do tronco simpático foi demonstrado por Langley, que seccionou o tronco simpático cervical num estudo experimental em gatos <sup>68</sup>. Quase cem anos depois, McLachlan constatou a quase completa reinervação após três meses de ressecção do tronco simpático cervical em cobaias, abaixo do gânglio cervical superior <sup>69</sup>. Nessa mesma época, Purves foi ainda mais específico ao utilizar métodos eletrofisiológicos e demonstrar a regeneração das fibras simpáticas pré-ganglionares <sup>70</sup>.

### 2.5.1 Degeneração Walleriana

A divisão de um axônio em dois segmentos, um proximal, em continuidade com o pericário e um distal, separado da célula nervosa, cria um espaço intersegmentar de dimensões variáveis e promove uma reação inflamatória local, reparadora, como nos demais tecidos lesados. Há um extravasamento do axoplasma e do plasma sangüíneo, que leva à formação

de uma matriz entre os dois segmentos do nervo lesado, composta por fibrina e fibronectina. Também migram para o local macrófagos vindos da corrente sanguínea, fibroblastos, células endoteliais e células de Schwann<sup>34, 36</sup>. A primeira alteração morfológica a acontecer nos segmentos proximal e distal é a retração da mielina até os nódulos de Ranvier, constrictões na bainha de mielina que permite o salto do impulso nervoso durante a despolarização do axônio, processo que se espalha distalmente com a fragmentação da mielina e do cilindro do axônio (Figura 9)<sup>36</sup>. Os produtos dessa fragmentação são fagocitados tanto pelas células de Schwann quanto pelos macrófagos. A invasão dos macrófagos no coto distal contribui para a regeneração, pois removem substâncias inibitórias associadas com a mielina e indiretamente liberam fatores (mitógenos para células de Schwann e fibroblastos, além de citocinas) que estimulam o reparo celular<sup>71, 72</sup>. As células de Schwann multiplicam-se, atingindo até dez vezes a população original, formando um cordão, ou bandas de Büngner, dentro da lâmina basal<sup>73</sup>. Elas mudam o seu fenótipo de mielínica para amielínica, por meio de mecanismos de regulação de várias proteínas, como fatores de transcrição, fatores neurotróficos, moléculas de adesão e componentes de membrana basal, incluindo laminina, fibronectina, vários proteoglicanos e colágeno<sup>74</sup>.

### 2.5.2 Efeito Retrógrado da Lesão Axonal

A neurotomia provoca uma retração do coto proximal do axônio por uma pequena distância, adquirindo uma configuração espiralada. Há uma

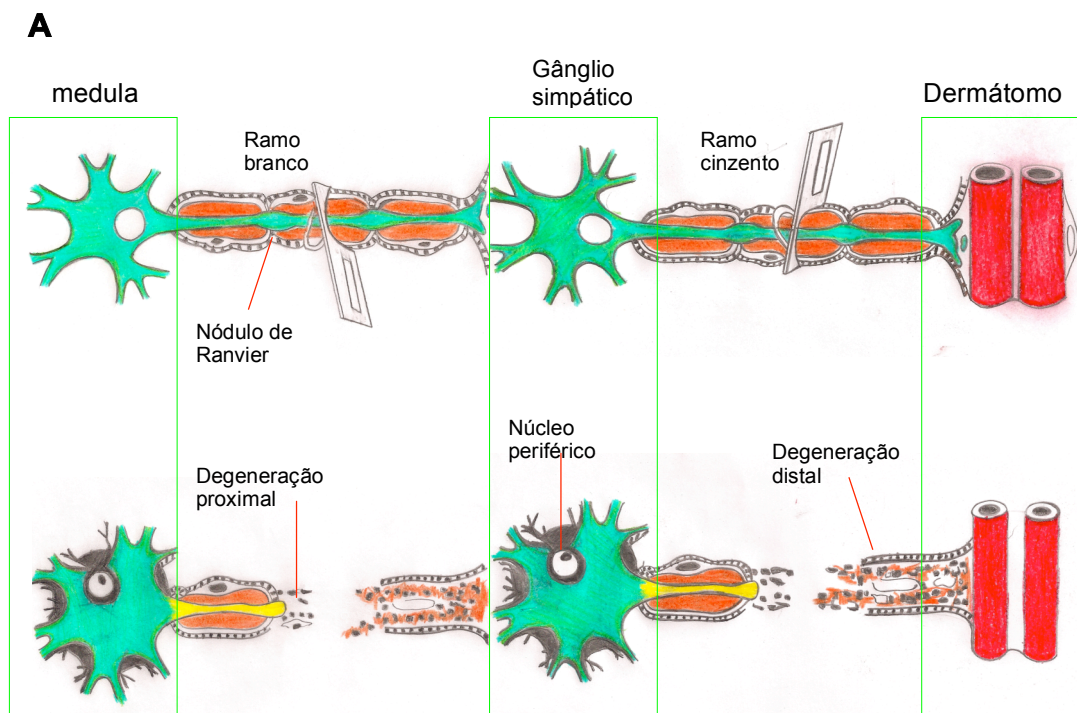
fragmentação da bainha do internódulo próximo à lesão e uma diminuição do diâmetro do axônio. As alterações metabólicas estão relacionadas com a diminuição de componentes do citoesqueleto provenientes do pericário. Geralmente é ativado um mecanismo de transporte retrógrado, do coto proximal em direção ao corpo celular, que causa um aumento no metabolismo da célula nervosa. Inicia-se então um fenômeno chamado de cromatólise, caracterizado pela dissociação da substância de Nissl, ou corpos tigróides, e a desintegração de grandes porções do retículo endoplasmático rugoso, seguida da dispersão dos ribossomos no citoplasma do pericário. Observa-se ainda um aumento do volume e deslocamento do núcleo para a periferia do pericário (Figura 9) <sup>35, 36, 75</sup>.

O coto proximal dilata-se pelo acúmulo de estruturas como o retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e microtúbulos, formando o cone de crescimento, originando junto ao nódulo de Ranvier mais próximo do local da lesão, no espaço deixado pela retração parcial das células de Schwann, um grande número de finos prolongamentos chamados de brotamentos ou neuritos. Também há aumento na síntese protéica superior a 100 vezes a produção normal <sup>35, 36, 76</sup>.

### 2.5.3 Processo de Regeneração

O processo de regeneração inicia-se poucas horas após o trauma; os prolongamentos dos axônios em regeneração são produzidos no nódulo de Ranvier, o qual possui um axolema com revestimento eletrodense que desaparece, dando lugar à protrusão da membrana plasmática. Esse

brotamento de axônio geralmente contem vesículas de diferentes tamanhos e conforme evolui para um cone de crescimento, o número de vesículas aumenta<sup>76</sup>.



**B**

Figura 9 – Desenho mostrando (A) secção dos ramos comunicantes pré e pós-ganglionares e (B) degeneração Walleriana proximal e distal à secção do axônio.

Múltiplos brotos são produzidos no nódulo, que estendem-se por seus próprios túneis de lâmina basal no segmento proximal, atravessam o estreito caminho de tecido conectivo entre o coto proximal e distal, através das necessárias bandas de Büngner, e finalmente entram no segmento distal. Todos os brotos estendem-se através do espaço entre a lâmina basal e a membrana plasmática da célula de Schwann ou da bainha de mielina no

coto proximal (Figura 10). A bainha de mielina que permanece como um túnel vazio após os axônios terem se degenerado não serve como conduto para o crescimento dos axônios em regeneração, pois ela repele a adesão dos axônios. Eles então se aderem à superfície interna da lâmina basal ou na membrana plasmática da célula de Schwann<sup>72, 74</sup>.

Se algum axônio em regeneração contornar as bandas de Büngner e penetrar no compartimento de tecido conectivo, ele interromperá o crescimento após percorrer poucos milímetros. Portanto a coluna de células de Schwann desempenha um papel relevante para propiciar um ambiente favorável ao crescimento axonal, além de manter sua capacidade de remielinizar os axônios na fase recente da cicatrização. Além disso, existe a ação estimulatória de moléculas localizadas na matriz extracelular, moléculas como o fator de crescimento do nervo (NGF), a molécula de adesão celular (N-CAM), N-caderina e as integrinas X1B1 e X6B1, que possuem forte influência sobre o crescimento e orientação dos axônios, tanto na sua fase de formação como na regenerativa<sup>35, 77</sup>.

A adequada recuperação da função neural depende da correta conexão com os órgãos alvo. Nos casos de interrupção do axônio, os vários brotamentos originados no coto proximal podem se conectar em tubos inapropriados do coto distal e, portanto, atingir alvos inapropriados. A acurácia da regeneração dependerá então da proximidade dos cotos, do tempo de lesão, dos mecanismos de orientação e da região do corpo inervada<sup>77, 78</sup>.

Existem evidências de que o sistema nervoso autônomo apresenta boa recuperação da função após a reconexão de axônios pré-ganglionares com nervos pós-ganglionares depois de uma axioniotomia <sup>45, 68, 69, 79</sup>.

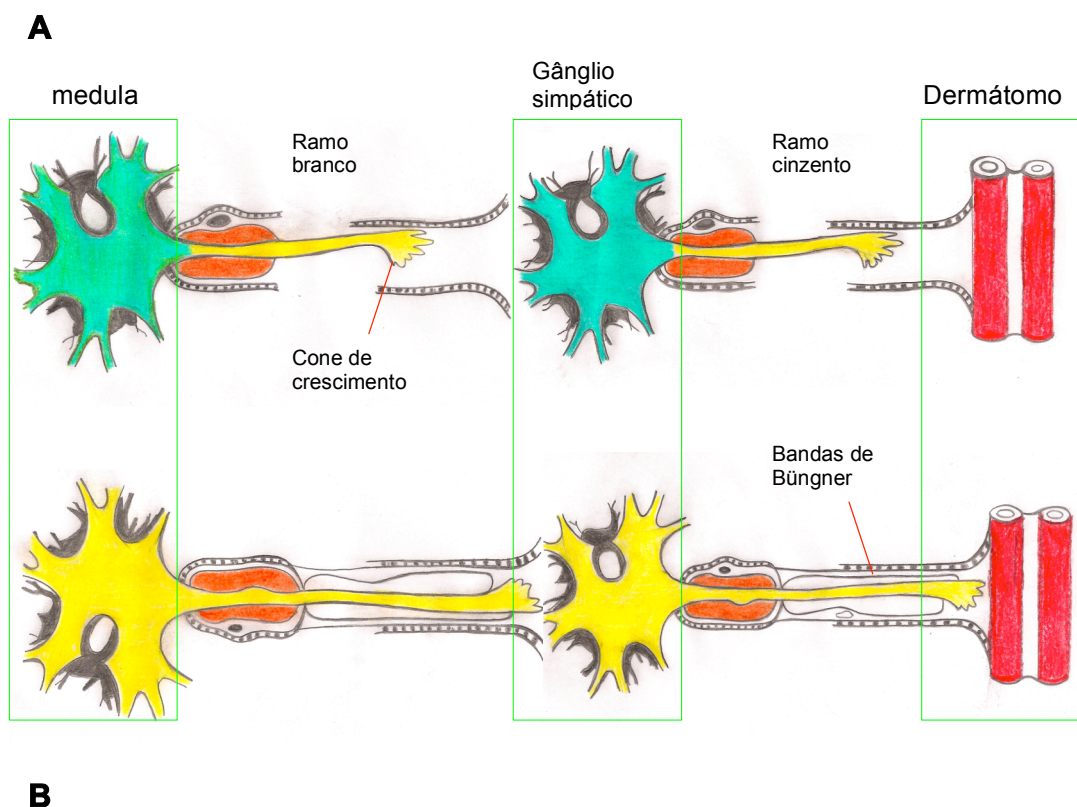


Figura 10 – Representação esquemática do processo de regeneração neural. A) formação dos prolongamentos de axônio do coto proximal e do cone de crescimento e B) formação da banda de Büngner que direciona os prolongamentos até o órgão alvo.

A capacidade de reconstituição neural após a ressecção simpática demonstrada experimentalmente <sup>79</sup> pode justificar a alta taxa de recidiva da hiperidrose primária pós ramicotomia, uma vez que nela a lesão axonal provocada e a distância entre os cotos são menores que numa simpatectomia convencional, o que pode favorecer a regeneração.

**OBJETIVO**

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os ramos comunicantes do terceiro gânglio simpático, após simpaticotomia seletiva experimental em suínos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Criar um modelo experimental em suínos que possibilite reproduzir os procedimentos cirúrgicos utilizados no humano, bem como a avaliação histológica do tronco simpático.

b) Identificar a presença macroscópica de regeneração dos ramos comunicantes após 15, 45, 90, 135 e 180 dias de pós-operatório;

c) Definir a temporalidade dos eventos histológicos presentes nos ramos comunicantes após a ramicotomia;

d) Avaliar os aspectos qualitativos e quantitativos dos indicadores de cicatrização e regeneração presentes nos ramos comunicantes.



## **MATERIAL E METODOS**

## **4 MATERIAL E METODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro de Educação e Tecnologia em Ciências da Saúde – UNICETREX em Brasília/DF, com a colaboração do médico Dr. Elias Couto Almeida Filho e do veterinário Dr. José Belarmino Gama Filho, e a análise histológica no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com a colaboração da patologista Dra. Vera Luiza Capelozzi.

### **4.1 ANIMAIS UTILIZADOS**

Foram utilizados 28 suínos machos, de raça mista (Large White x Landrace), com idade média de 52 dias (variando de 45 a 60 dias por ocasião do procedimento cirúrgico) e com peso médio de 17,9 kg (14 a 25 kg) provenientes do criadouro da fazenda do Centro de Educação e Tecnologia em Ciências da Saúde no Brasília/DF.

### **4.2 BEM ESTAR ANIMAL**

Todos os animais foram mantidos em recinto provido de água e ração balanceada fornecida por bebedouro e comedouro automáticos, piso impermeável e lavável, bem como ambiente com ventilação adequada para evitar estresse térmico.

Os animais receberam antibioticoprofilaxia, iniciada durante a indução anestésica, com 1ml/dia de enrofloxacina a 5% administrado por via intramuscular durante 3 dias e analgesia pós-operatória com injeção intramuscular de 25 mg de diclofenaco de sódio de 12/12 h por 3 dias.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS E RANDOMIZAÇÃO

Todos os animais (n=28) foram submetidos ao procedimento padrão de simpaticotomia seletiva bilateral por videotoroscopia (totalizando 56 ramicotomias), conforme descrito no item 4.5. Optou-se por definir o período dos sacrifícios com 15 dias de pós-operatório, tempo suficiente para estudar as alterações inflamatórias iniciais e a degeneração Walleriana, e a cada 45 dias de pós-operatório (DPO) até o sexto mês, período suficiente para estabilizar o processo cicatricial.

A randomização seguiu o processo de sorteio simples com números aleatórios atribuídos para cada animal logo após a cirurgia, determinando sua alocação em um dos cinco grupos assim dispostos:

Grupo I (n=4) – animais sacrificados com 15 DPO;

Grupo II (n=6) – animais sacrificados com 45 DPO;

Grupo III (n=6) – animais sacrificados com 90 DPO;

Grupo IV (n=6) – animais sacrificados com 135 DPO;

Grupo V (n=6) – animais sacrificados com 180 DPO.

Em dois espécimes de cada grupo, escolhidos randomicamente, também foram ressecados um segundo gânglio, intácto, não operado,

localizados dois espaços costais abaixo do espaço operado, para compor o grupo controle histológico íntegro (Grupo 0 com n=10). O mecanismo de criação do grupo 0 permitiu homogeneizar os animais controles, já que eles sofrem alterações constitucionais ao longo do tempo, aumento do tamanho, massa muscular e gordura, além de evitar gastos desnecessários com a confecção de lâminas histológicas em excesso.

#### 4.4 ANESTESIA E REGIME VENTILATÓRIO

Os animais foram submetidos à anestesia geral venosa padrão, executadas por um médico veterinário, com indução através de infusão em *bolus* de 3 ml/kg de solução a 10% de xilazina, quetamina e diazepam. Em seguida procedeu-se a entubação orotraqueal com tubo simples número 6,5 (Rüsch), que após a fixação foi conectado a um ventilador Takaoka ciclado com 10ml/kg de volume corrente, a 12 irpm de frequência respiratória e abastecido por uma cápsula de oxigênio a 100%. O animal foi mantido com hidratação venosa com infusão de 3 ml/kg/h de solução fisiológica a 0,9% e em anestesia geral com infusão em *bolus* de 0,1 mg/kg de brometo de pancurônio e 5 mcg/kg de citrato de fentanila, repetidos a cada 30 minutos ou quando necessário.

#### 4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram submetidos à videotoracoscopia bilateral, inicialmente pela esquerda, em decúbito lateral direito, com a utilização de três portais. O primeiro trocater de 10 mm é posicionado no 4º espaço intercostal, na linha axilar anterior, para introdução da óptica de 30° e realização do pneumotórax (com auxílio de insuflador de CO<sub>2</sub> calibrado com pressão máxima de 5 cm de H<sub>2</sub>O e fluxo máximo de 4 l/min). Um segundo trocater de 5mm posicionado no 3º espaço intercostal, na linha médio-axilar, para introdução de pinça Maryland ou Hook e um terceiro trocater de 10 mm no 4º espaço intercostal na linha axilar posterior e introdução da tesoura endoscópica.

Após a instalação do pneumotórax, o tronco simpático sobre a 3ª e 4ª costelas foi identificado e, com o auxílio da pinça e tesoura, efetuou-se a abertura e elevação da pleura parietal com completa exposição da cadeia simpática no 3º espaço intercostal. Em seguida elevou-se o nervo com um Hook exatamente acima das costelas e com a tesoura procedeu-se a secção de todas as estruturas que estavam conectadas ao tronco no referido segmento, o que permitiu a secção de todos os ramos comunicantes para o gânglio (Figura 11 e 12). Um marcador metálico foi posicionado no músculo intercostal distando  $\pm$  5 cm lateralmente ao gânglio dissecado para facilitar a identificação do segmento correto a ser ressecado para análise histológica durante a eutanásia<sup>68, 69, 80</sup>. Nos casos em que houve acidente com lesão vascular, os sangramentos foram controlados apenas por compressão

através de um pinça, para evitar qualquer lesão neural por queimadura elétrica indesejada.

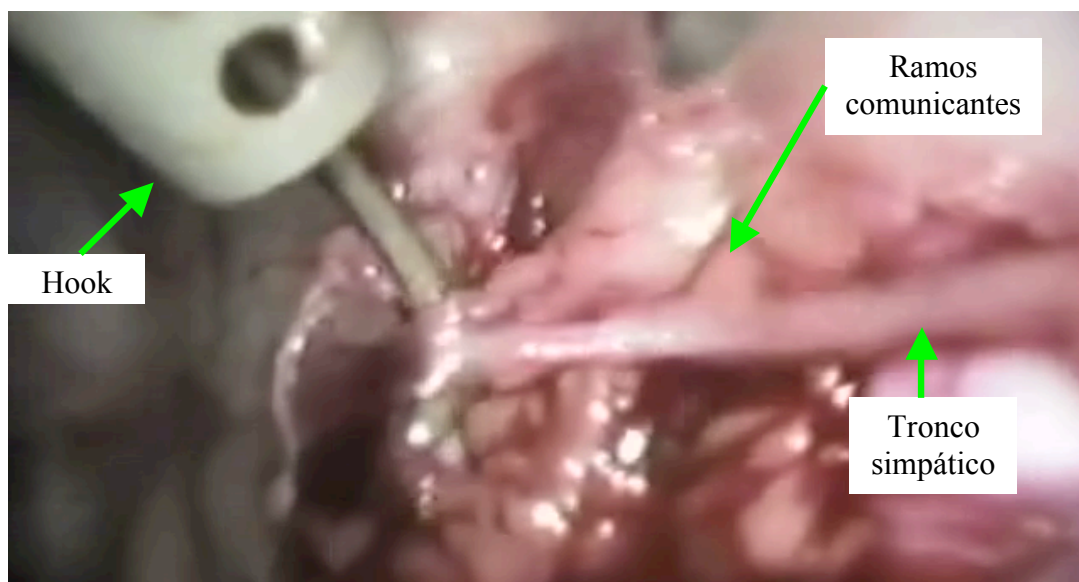


Figura 11 – Foto mostrando o tronco simpático elevado por um Hook e expondo os ramos comunicantes.

O pneumotórax foi desfeito através da introdução de sonda tipo nelaton 12F pelo trocater de 5mm sob selo d'água seguido de manobras de Valsalva executadas pelo anestesista. As incisões foram suturadas por planos com fio de nylon 3-0 e fechadas com curativo oclusivo.

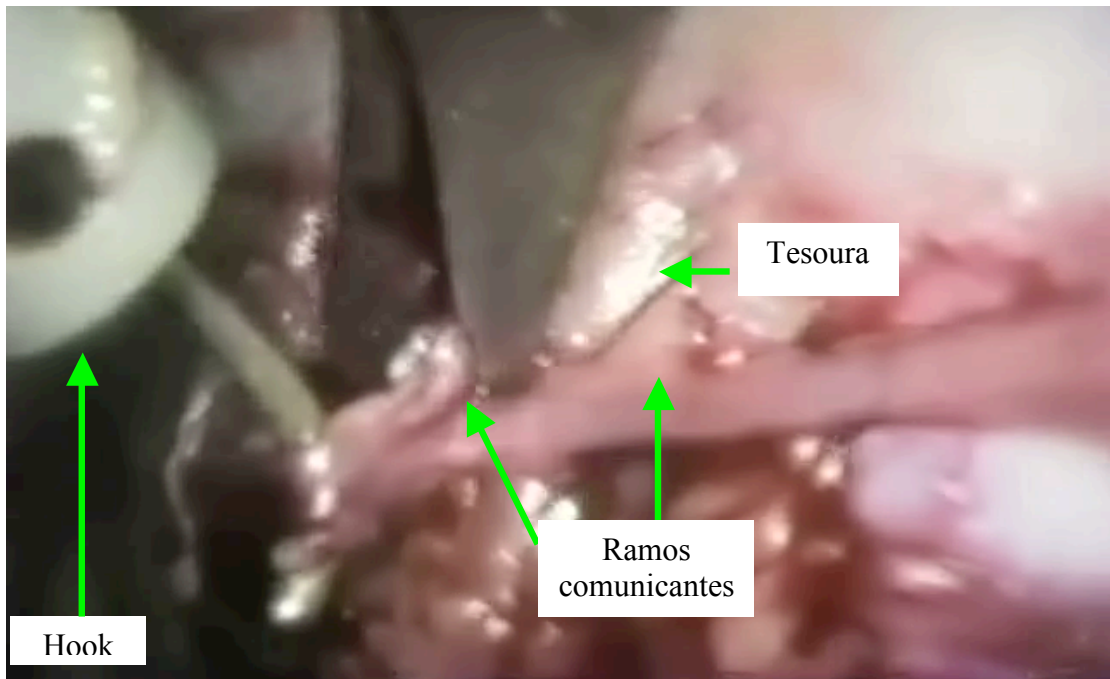


Figura 12 – Foto mostrando a secção dos ramos comunicantes com tesoura endoscópica posteriormente à cadeia simpática.

#### 4.6 EXTRAÇÃO DO SEGMENTO DA CADEIA SIMPÁTICA

Os animais foram sacrificados com injeção intravenosa em *bolus* de 20 ml de tiopental sódico a 5% e 50 ml de KCl a 15% e submetidos à toracotomia mediana manúbrio-púbica. Nesse momento foram identificados os segmentos do tronco simpático operados, através de aderências pleurais e da presença do clipe metálico (Figura 13).

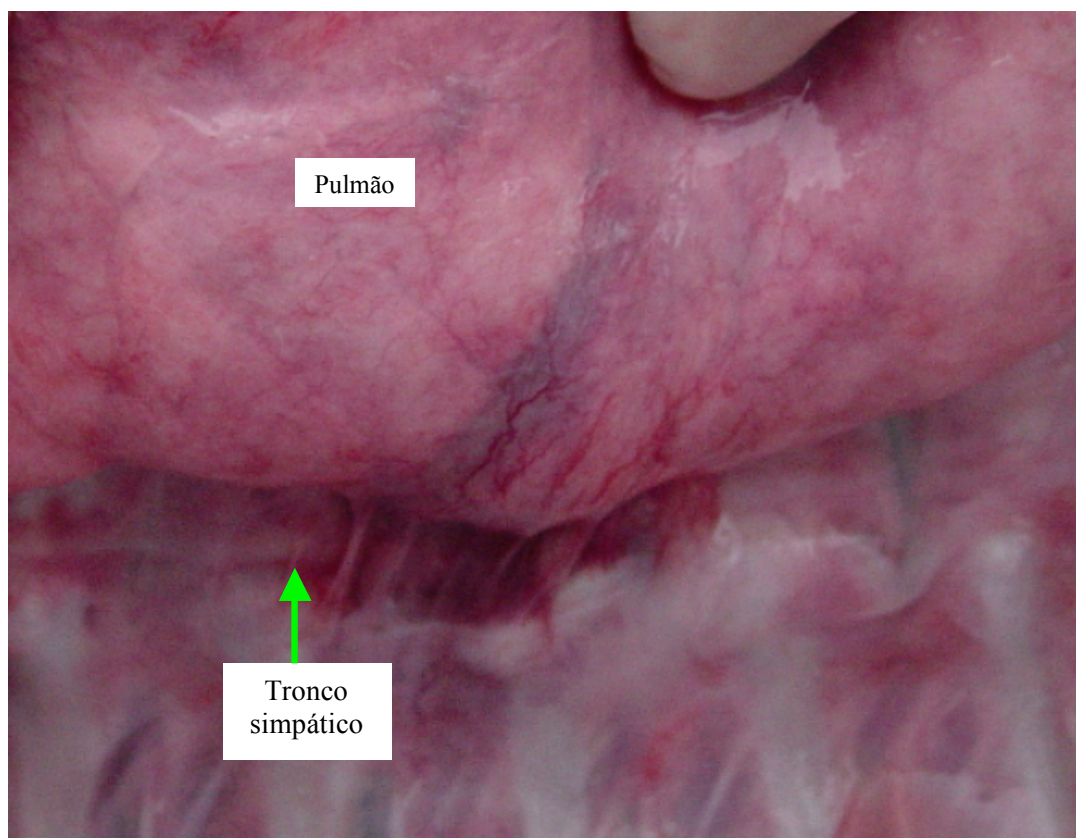


Figura 13 – Foto mostrando aderências pleuro-pulmonares cicatriciais em local do procedimento cirúrgico.

A extração do bloco contendo pleura, tronco simpático, músculos intercostais, costelas e corpos vertebrais foi realizada com auxílio de uma serra elétrica, com margem mínima de 5 cm lateral, medial, cefálica e caudal ao segmento do tronco simpático operado (Figura 14). Os blocos foram novamente dissecados, com auxílio de uma lupa, retirando-se os excessos de tecidos adjacentes à cadeia simpática, ossos, músculos e gorduras, respeitando-se os limites laterais e profundos de no mínimo 5 mm. Foram utilizados como limites longitudinais a borda superior da 3<sup>a</sup> costela e a borda inferior da 4<sup>a</sup> costela. Durante a dissecação do tronco simpático foi avaliada



a presença de regeneração macroscópica, através da identificação de estruturas adjacentes ao gânglio, similares aos ramos comunicantes, (Figura 15). Após sua extração, o material foi fixado em formol a 10% por 8 horas, em seguida acondicionado em álcool a 70% e enviado ao laboratório de anatomia patológica.



Figura 14 – Foto mostrando o bloco extraído com serra elétrica com margens de segurança.

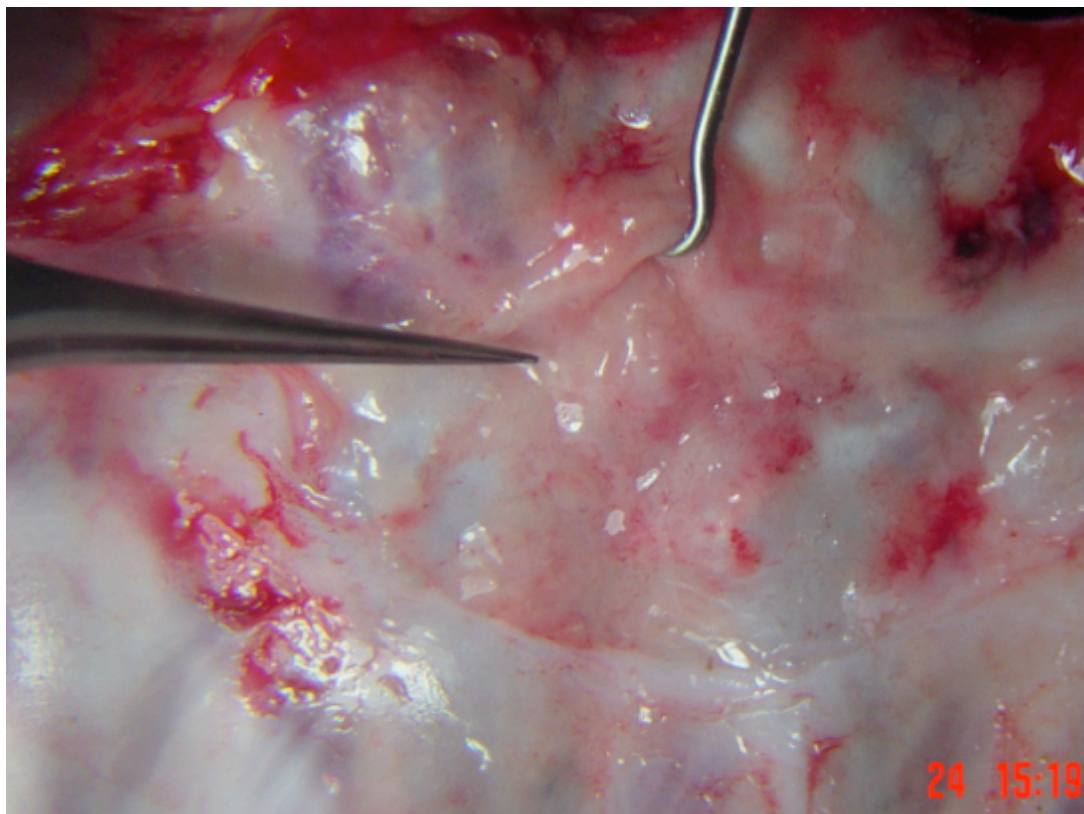


Figura 15 – Foto mostrando a identificação da regeneração macroscópica dos ramos comunicantes.

#### 4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a extração e o acondicionamento, o material foi encaminhado ao laboratório de imunopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para processamento.

#### 4.7.1 Variáveis Histológicas Estudadas

##### 4.7.1.1 Grau de Inflamação

Para avaliar as alterações morfológicas que ocorrem nos estágios iniciais do processo degenerativo, optou-se pela avaliação do grau de inflamação junto aos ramos comunicantes. A classificação do processo inflamatório foi através de análise subjetiva e semi-quantitativa das lâminas coradas com HE, possibilitando estudar tanto as alterações precoces da degeneração Walleriana, quanto o tempo de estabilização do processo de cicatrização e/ou regeneração.

##### 4.7.1.2 Bainha de Mielina

Identificada através da coloração de Weil, permite separar os ramos comunicantes em ramos pré-ganglionares, brancos, ricos em mielina e ramos pós-ganglionares, cinzentos, pobres em mielina.

##### 4.7.1.3 Células de Schwann

Quantificadas com ajuda de reações imuno-histoquímicas utilizando-se o anticorpo S-100. Identificar as células de Schwann é importante pois elas estão presentes tanto na degeneração quanto na regeneração Walleriana.

#### 4.7.1.4 Fibras de Colágeno

A deposição de fibras de colágeno deve estar diretamente relacionada à falta de regeneração, ou pelo menos à dificuldade do ramo regenerado em desempenhar sua função. As fibras grossas e finas de colágeno são as principais responsáveis pela fibrose na cicatrização e podem ser identificadas através do reconhecimento das frequências de luz correspondentes às fibras birrefringentes, quando analisadas sob luz polarizada. A quantificação das fibras de colágenos grossas e finas permite avaliar a porcentagem de área do nervo substituída por tecido fibrótico.

#### 4.7.1.5 Fibras Reticulares

As fibras reticulares, compostas por colágeno tipo III e de 6 a 12% de açúcares, constituem parte importante do envoltório conjuntivo do endoneuro. Sua manutenção ou restauração, após a secção do nervo, deve estar relacionada diretamente à regeneração dos ramos comunicantes. A quantificação das fibras reticulares é feita através de coloração específica de reticulina de Gomori e permite avaliar o grau de restauração da arquitetura e regeneração neural.

#### 4.7.2 Fixação e Inclusão

Após a coleta do material, os fragmentos de tecido contendo o segmento do tronco simpático, com tamanho máximo de 2 cm, dissecados conforme explicado no item 4.6, foram introduzidos em frascos contendo solução fixadora de aldeído fórmico a 10% que permitiam uma proporção de

1:10 a 1:20 entre o tamanho do tecido e o volume de solução. Após 6 a 8 horas, período no qual se obteve uma fixação adequada, o aldeído fórmico foi substituído por álcool a 70% e o material foi encaminhado para o laboratório de histologia.

No laboratório o material foi desidratado através de banhos em solução alcoólica em concentrações crescentes (70% a 100%) e diafanizado substituindo o agente desidratante por xilol. O material foi então submetido a banhos em parafina a 65° C para impregnação e conservação das estruturas celulares. Os fragmentos foram incluídos verticalmente dentro de moldes em L (quadro de Leuckhart) preenchidos com parafina aquecida, afim de permitir o correto posicionamento do material dentro dos blocos de parafina, permitindo os cortes transversais do tronco simpático.

#### 4.7.3 Confeção das Lâminas e Padronização dos Cortes

Os blocos foram submetidos a cortes histológicos de 4 µm de espessura mediante a utilização de um micrótomo de parafina (LEICA RM 2145). Os cortes obtidos foram montados sobre lâminas de microscopia e estendidos em banho com água e gelatina aquecidos a 58° C. Posteriormente as lâminas permaneceram em estufa aquecida a 37° C por duas horas, em seguida foi realizado uma coloração rápida com hematoxilina e eosina (HE). A coloração com HE é um método rápido, barato e que permite uma boa identificação do tronco simpático, gânglio e ramos comunicantes, por isso foi utilizada na identificação dessas estruturas. Em seguida, optou-se por fatiar toda a extensão do gânglio simpático para definir

se todos os ramos comunicantes do 3º gânglio foram seccionados e se eles tinham ou não sinais de regeneração neural. Antes de cortar todo o gânglio, analisou-se a primeira lâmina de cada bloco e quando não foi possível identificar o gânglio simpático, procedeu-se a seqüências de cortes de 4 µm de espessura a cada 200 µm de profundidade até encontrá-los. Dessa forma, quando o gânglio foi encontrado, mas não foi identificado os ramos comunicantes, procedeu-se novamente a seqüências de cortes de 4 µm de espessura a cada 50 µm de profundidade até encontrá-los, dessa vez foi utilizado uma profundidade menor para maior precisão na identificação dos ramos.

No momento em que foi definido o nível adequado de corte, com identificação do gânglio e seus ramos comunicantes, para cada bloco de parafina, foi estipulado 5 níveis de corte para a obtenção de 8 lâminas em cada nível, distando 30 µm do final de cada nível até o início de outro. Dessa forma todo comprimento do gânglio foi consumido por uma série de cortes finos, garantindo a visualização de todas as estruturas a ele conectadas.

As primeiras lâminas de cada nível foram coradas com HE e analisadas ao microscópio óptico, definido-se assim qual seria a melhor seqüência de cortes para realização das outras colorações específicas e da imuno-histoquímica.

#### 4.7.4 Técnicas de Coloração Empregadas

Antes da realização das colorações histoquímicas, todas as lâminas foram submetidas à desparafinização com banhos em xilol, solução alcoólica em concentrações decrescentes de 100% a 70% e água corrente por cinco minutos.

##### 4.7.4.1 Hematoxilina e eosina (HE)

A hematoxilina de Harris foi preparada dissolvendo-se cinco gramas de hematoxilina em 50 ml de álcool absoluto e adicionando-se uma solução de 100 g de sulfato de alumínio e potássio e 1000 ml de água destilada morna. Acrescenta-se 2,5 g de óxido de mercúrio deixando-a ferver em um balão volumétrico durante cinco minutos, a solução foi esfriada a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro.

A Eosina foi preparada com a mistura de duas soluções, uma com 2,5 g de eosina e 200 ml de álcool absoluto e a outra com 750 ml de álcool a 80% e 5 ml de ácido acético.

A coloração dos cortes histológicos com HE seguiu as seguintes etapas:

1. Desparafinização;
2. Lavagem em água corrente por 5 min;
3. Coloração com hematoxilina por 2 min;
4. Lavagem em água corrente por 10 min;
5. Coloração com eosina por 1 min;
6. Lavagem em ácido acético a 1% por 1 min;

7. Desidratação em álcool e xilol;
8. Montagem da lamínula com bálsamo do Canadá.

A coloração com HE permitiu a visualização das diferentes estruturas histológicas; núcleos celulares em azul-escuro e citoplasma em róseo-avermelhado. Foi utilizada para a padronização dos cortes seriados descritos anteriormente, bem como para análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório perineural.

#### 4.7.4.2 Picrossírius

Para a identificação das fibras de colágeno, grossas e finas, foi utilizada a coloração de picrossírius, que na sua composição apresenta duas soluções: uma formada por 0,1 g de sirius red com ácido pícrico saturado em 100 ml de água destilada e a outra formada por solução de hematoxilina de Carazzi, que consiste de 0,5 g de hematoxilina diluída em 400 ml de água destilada e 0,25 g de sulfato de alumínio e potássio com 1 g de iodato de potássio em 100 ml de glicerina.

As colorações dos tecidos seguiram os seguintes passos:

1. Desparafinização;
2. Hidratação dos cortes em álcool de concentrações decrescente de 100% a 70% e água destilada;
3. Coloração com solução de sirius red por 1 h;
4. Lavagem em água corrente por 5 min e água destilada;
5. Coloração com Hematoxilina de Carazzi por 5 min;
6. Lavagem em água corrente por 5 min e água destilada;



7. Desidratação em álcool e xilol;
8. Montagem da lamínula com bálsamo do Canadá.

Os cortes histológicos foram analisados no microscópio sob luz polarizada, identificando-se as fibras de colágeno em tons de vermelho, amarelo e verde, conforme demonstrado na figura 16.

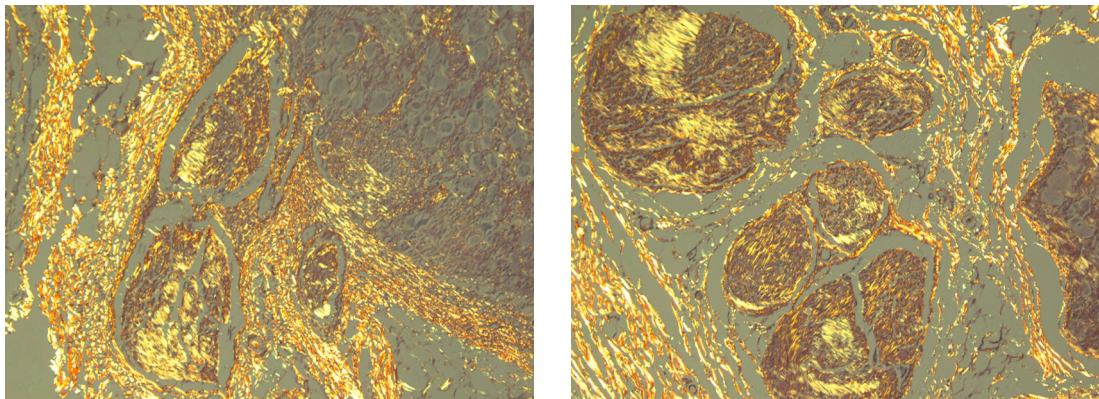


Figura 16 – Fotos mostrando cortes corados com a coloração de picrossírius evidenciando as fibras de colágeno sob luz polarizada.

#### 4.7.4.3 Reticulina de Gomori

As fibras reticulares dos feixes nervosos foram marcadas mediante a coloração de Gomori, que foi preparada com 25 ml de nitrato de prata a 10% e 7 ml de hidróxido de potássio a 10%, ao precipitado formado é adicionado amoníaco puro gota a gota até dissolver, então acrescenta-se o dobro de água destilada.

A coloração dos tecidos seguiu a seqüência:

1. Desparafinização;

2. Hidratação os cortes em álcool de concentrações decrescente de 100% a 70% e água destilada;
3. Banho em permanganato de potássio a 1% por 2 min;
4. Banho em metabissulfito de potássio a 2% por 1 min;
5. Lavagem em água corrente por 2 min;
6. Banho em sulfato de amônio ferro a 2% por 1 min;
7. Lavagem em água corrente e água destilada;
8. Banho em nitrato de prata por 4 min;
9. Lavagem em água destilada por 30 seg;
10. Banho em formalina a 20% por 3 min;
11. Lavagem em água corrente por 3 min e água destilada;
12. Banho em cloreto de ouro a 0,1% por 5 min
13. Enxague em água destilada por 3 vezes;
14. Banho em metabissulfito de potássio a 2% por 1 min;
15. Banho em tiossulfito de sódio a 2% por 1 min;
16. Lavagem em água corrente por 2 min;
17. Desidratação em álcool e xilol;
18. Montagem da lamínula com bálsamo do Canadá.

Os cortes histológicos foram analisados no microscópio sob luz polarizada, identificando-se as fibras reticulares em tons de cinza-escuro conforme demonstra a figura 17.

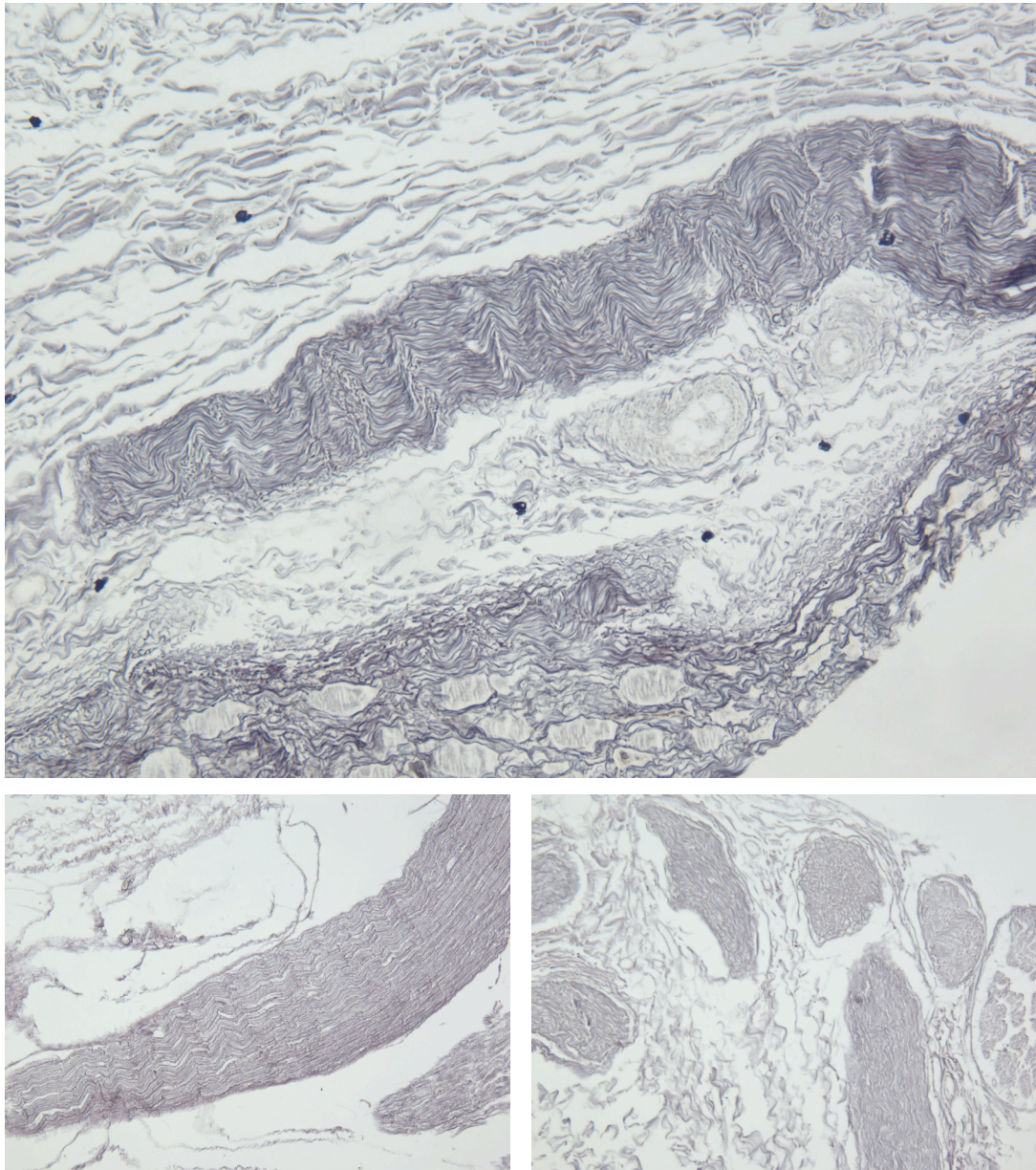


Figura 17 – Fotos mostrando ramos nervosos corados em tons cinza-escuro com a coloração de reticulina de Gomori.

#### 4.7.4.4 Weil

Para identificação das bainhas de mielina foi utilizada a coloração de Weil que é constituída por uma solução com hematoxilina a 5% dissolvida em 5 ml de álcool a 95% e 45 ml de alúmen de ferro amoniacal a 4%.

A coloração mediante esta técnica seguiu os seguintes passos:

1. Desparafinização;
2. Hidratação dos cortes em álcool de concentrações decrescente de 100% a 70% e água destilada;
3. Banho em solução de hematoxilina-alúmen férrico amoniaco a 4% por 30 min;
4. Lavagem em água corrente por 5 min;
5. Diferenciação das lâminas, controlando ao microscópico, até que o fundo fique em tom cinza azulado e as fibras de mielina estejam nítidas;
6. Lavar as lâminas em água corrente por 5 min;
7. Término da diferenciação com borato de sódio a 5% durante alguns segundos;
8. Lavagem em água corrente e água destilada;
9. Desidratação em álcool e xilol;
10. Montagem da lamínula com bálsamo do Canadá.

Os cortes histológicos permitiram a diferenciação entre os ramos comunicantes ricos em mielina, pré-ganglionares, que se apresentaram em tons cinza-escuro e os ramos pobres em mielina, pós-ganglionares, que se apresentaram em tons cinza-claro, conforme demonstrado na figura 18.

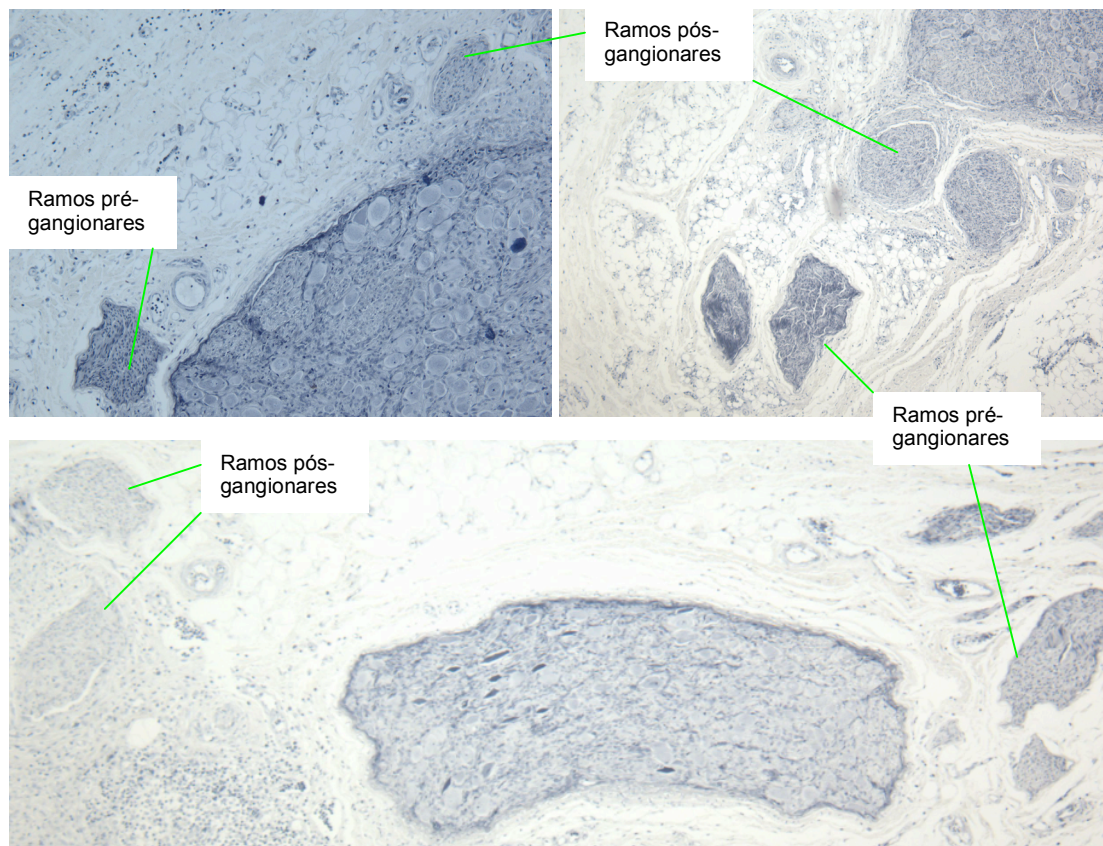


Figura 18 – Fotos mostrando cortes corados pela coloração de Weil evidenciando os ramos brancos, ricos em mielina, corados em tons escuros e cinzentos, pobres em mielina, corados em tons claros.

#### 4.7.5 Procedimentos de Imuno-histoquímica

A marcação imuno-histoquímica permitiu identificar as células de Schwann nos diferentes feixes nervosos. A coloração castanha evidenciou a expressão do antígeno S-100 nas células de Schwann, destacando-as dos outros grupos celulares.

#### 4.7.5.1 Técnica de Silanização

Antes da realização dos cortes, as lâminas foram mergulhadas em uma cuba com álcool, duas cubas consecutivas com acetona e depois em mais duas cubas consecutivas com silane (SIGMA A3648), permanecendo por cinco minutos em cada cuba. O processo de silanização terminou com mais quatro banhos, sendo dois em cubas com acetona e outros dois em água destilada.

#### 4.7.5.2 Técnica de Imuno-histoquímica padrão

Os cortes histológicos de 4 µm de espessura selecionados, conforme explicado no item 4.7.2, para imuno-histoquímica foram montados em lâminas silanizadas, sem a realização de coloração. As lâminas foram então submetidas à técnica de imuno-histoquímica padrão, conforme o seguinte protocolo: primeiramente estas foram desparafinizadas em banho de 20 minutos em xilol aquecido a 95° C, seguido de três banhos de xilol à temperatura ambiente. Em seguida, o tecido foi hidratado submergindo-se as lâminas em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70%, respectivamente, procedeu-se então a lavagem em água corrente e em água destilada e deionizada. O próximo passo foi a recuperação antigênica, realizada em panela a vapor, na qual foi colocado o berço com as lâminas em cuba com solução de citrato 10 mM, pH 6,0 a 95-100° C. Após 35 minutos, a cuba com as lâminas foi retirada e permaneceu mais 20 minutos em temperatura ambiente para esfriar. Então, realizou-se a lavagem em tampão fosfato de sódio 0,05 mM, pH 7,2-7,4 (PBS) por três vezes, três minutos cada. Na

seqüência, procedeu-se ao bloqueio das peroxidases endógenas, lavando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio 10 V (3%), sete vezes por cinco minutos. Então, as lâminas foram lavadas três vezes em água corrente, três vezes em água destilada e mais três vezes em PBS, cada lavagem durando três minutos. O próximo passo foi o bloqueio de sítios inespecíficos, colocando-se as lâminas em leite desnatado 2% diluído em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram, em seguida, escorridas e secas ao redor do corte.

#### 4.7.5.3 Marcação do antígeno S-100

O anticorpo primário S-100 clone Z0311 (Dako A/S, Copenhagen, Denmark) diluído 1:200, foi utilizado para identificação das células de Schwann, este anticorpo foi pingado em uma lâmina pré-processada. A diluição foi feita em soro albumina bovina (BSA 0.5%, Sigma Diagnostics, St. Louis, USA). As lâminas foram cobertas com 100 µL dessa solução e permaneceram incubadas em câmara úmida em geladeira durante 18 horas. Após este período de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS três vezes por três minutos, secadas e montadas.

#### 4.7.6 Determinação das marcações imuno-histoquímicas

Para quantificar a marcação de expressão do antígeno S-100 depois da imuno-histoquímica, foi usada a técnica do *point-counting*, que utiliza um retículo contendo 100 pontos e cinquenta retas, segundo proposto em 1988 por Gundersen e colaboradores<sup>81</sup>. Ao aumento de 400X, foram

examinados os campos microscópicos coincidentes aos ramos comunicantes brancos e cinzentos determinados previamente pela coloração de Weil na mesma série de cortes histológicos, cobrindo toda a área dos ramos nas referidas lâminas.

Áreas do tronco simpático que não correspondiam aos ramos comunicantes foram cuidadosamente evitadas durante as medições.

Tendo em vista os diferentes diâmetros dos ramos nervosos nas biópsias estudadas, só foram considerados os pontos que incidiam dentro da área sólida do ramo nervoso. Os valores foram expressos em porcentagem de pontos positivos do total de pontos em área sólida do nervo, segundo com a formula:

$$P_{s-100} = (P_i_{s-100} \times 100) / P_{nervo}$$

$P_{s-100}$  reflete a densidade das células de Schwann presentes nos ramos comunicantes,  $P_i$  é o número de pontos que incidem sobre a positividade do marcador imuno-histoquímico e  $P_{nervo}$  é o total de pontos que incidem sobre área sólida do nervo. A  $P_{s-100}$  de cada caso foi calculada a partir da soma dos resultados  $P_i$  e  $P_{nervo}$  de todos os campos analisados para cada lâmina, que corresponde a um lado do tronco simpático operado em cada animal <sup>82</sup>.

#### 4.7.7 Análise do Sistema Colágeno e Fibras Reticulares

A técnica do Picrossírius permite a quantificação das fibras de colágeno, caracterizando-as grosseiramente em fibras grossas (vermelhas,



amarelas ou alaranjadas) e finas (verdes), segundo a tonalidade de birrefringência quando analisadas sob luz polarizada.

Para a análise dos casos corados com Picrossírius foi utilizado um analisador de imagem acoplado a um microscópio óptico equipado com um polarizador de luz. O sistema utilizado consiste de uma câmera Olympus acoplada a um microscópio Olympus (Clemex Technologies Inc. Longueuil, Canada) e um computador Pentium-III 3.0 Ghz equipado com um “*software*” Image ProPlus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). As imagens produzidas pelo microscópio foram capturadas e processadas digitalmente pelo “*software*” e visualizadas no monitor. Foram selecionados os campos de interesse e visualizados sob um aumento de 200 vezes. O brilho, o contraste e a luminosidade da imagem foram ajustados de modo que, sob a luz polarizada, as fibras de colágeno são facilmente identificadas como birrefringentes, independentemente de sua cor. Os mesmos valores de luminosidade, brilho e contraste foram utilizados para todas as medidas.

Com o auxílio do *software*, a área total em micrômetros quadrados de colágeno na amostra foi medida, através do reconhecimento das freqüências de luz correspondentes às fibras birrefringentes. O mesmo padrão de freqüências foi utilizado para todas as medidas, evitando-se assim qualquer viés de medida de área de colágeno por campo. Artérias e veias foram cuidadosamente evitadas durante as medidas. Na mesma amostra, foi medido também o total de área sólida do nervo, correspondente ao tecido dos ramos comunicantes presentes. Após serem feitas essas medidas foi

obtida a razão da área de colágeno em relação à área de tecido sólido do nervo daquele campo.

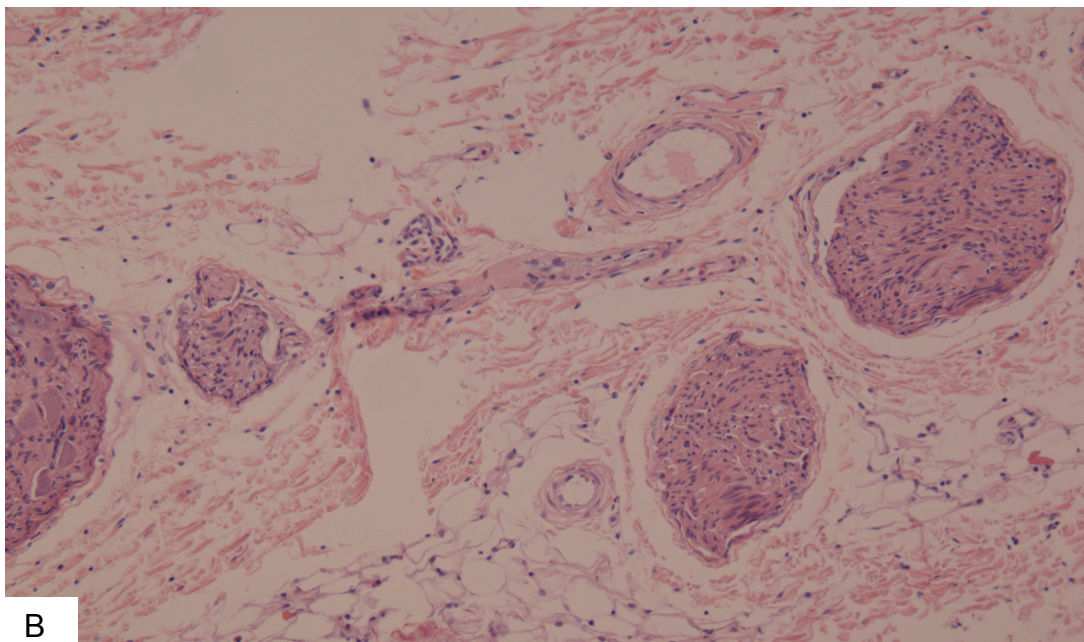
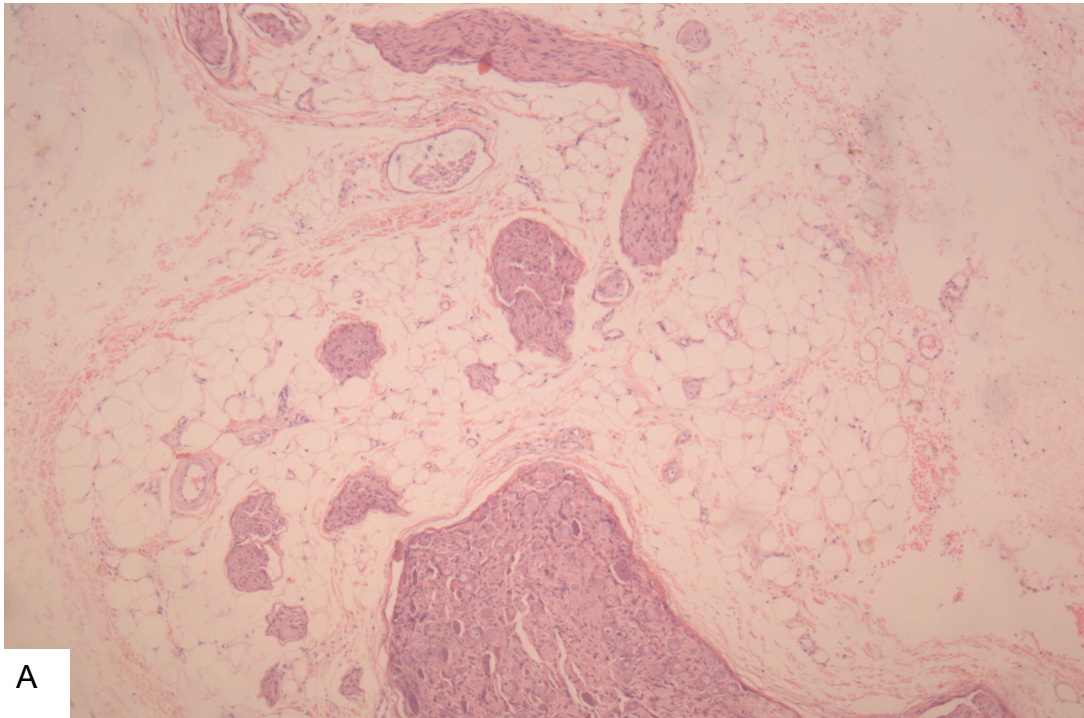
Para a análise dos casos corados com a Reticulina de Gomori foi utilizado o mesmo equipamento, sendo que a luminosidade, brilho e contraste da imagem foram ajustados de modo que as fibras reticulares foram facilmente reconhecidas como espectros de violeta. Os mesmos valores de luminosidade, brilho e contraste foram utilizados para todas as medidas.

Da mesma forma que o colágeno, a área total de fibras reticulares foi medida pelo reconhecimento das frequências luminosas correspondentes às fibras violeta da amostra. O mesmo padrão de frequência foi utilizado em todas as medidas, para que não existam variações entre elas. Foi medida também a área total de tecido sólido do nervo da mesma amostra, obtendo-se assim uma razão da área de fibras reticulares em função da área dos ramos comunicantes do nervo simpático.

#### 4.7.8 Classificação do Infiltrado Inflamatório

As lâminas coradas com HE escolhidas na seleção dos níveis adequados para a realização dos cortes ganglionares seriados, também foram utilizadas para a análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório. Dois pesquisadores analisaram independentemente todas as lâminas sem ter conhecimento do procedimento cirúrgico ou do grupo que cada corte histológico representava e classificaram em: (i) ausência de reação inflamatória; (ii) leve infiltrado inflamatório; (iii) moderado infiltrado

inflamatório e (iv) infiltrado inflamatório severo, conforme demonstra a figura 19. Os cortes histológicos com notas discordantes foram avaliadas por um terceiro pesquisador que definiu a classificação de cada caso.



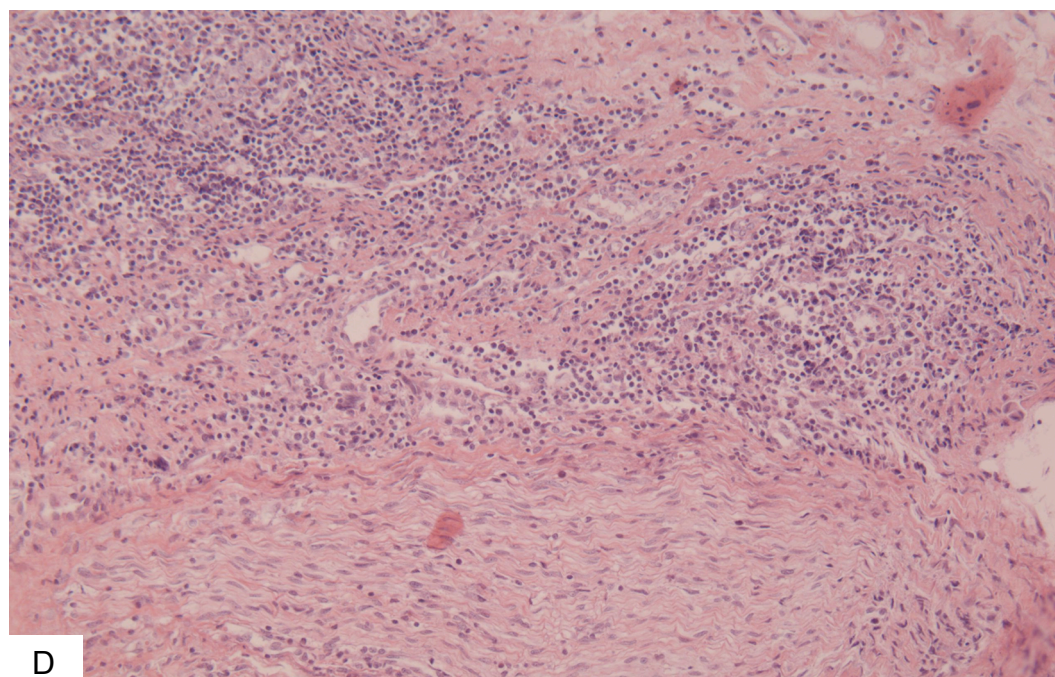
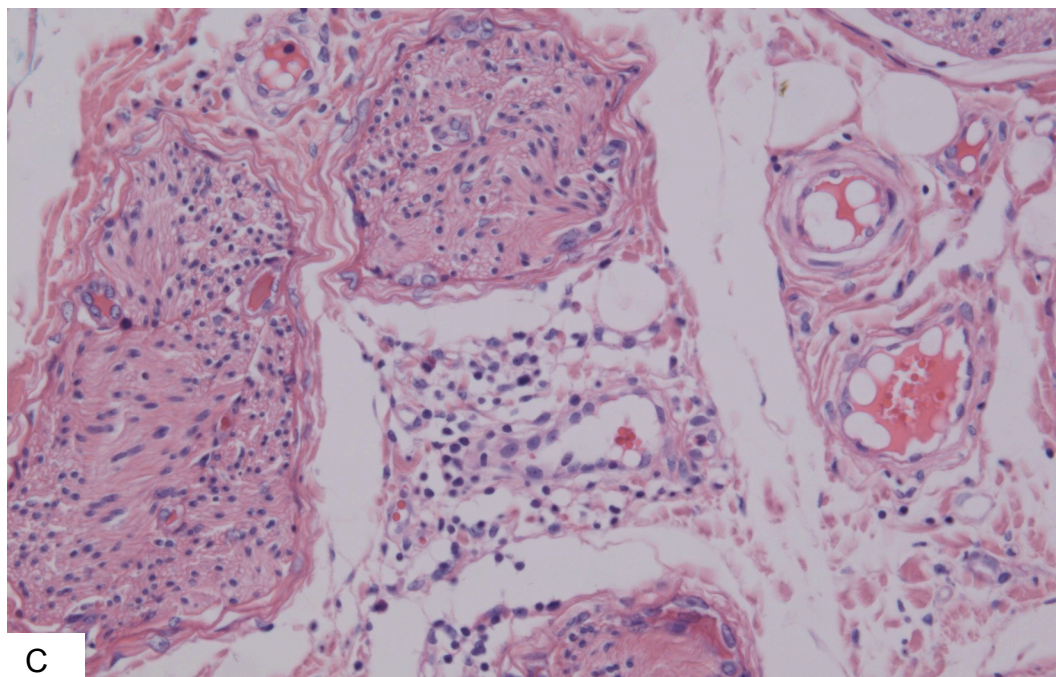


Figura 19 – Fotos de cortes corados com HE mostrando: A) Ausência de reação inflamatória; B) Leve infiltrado inflamatório; C) Moderado infiltrado inflamatório; E) Infiltrado inflamatório severo.

#### 4.8 Análise Estatística

O presente estudo é classificado metodologicamente como estudo analítico experimental do tipo ensaio clínico randomizado. O método de randomização, utilizado para alocação dos animais nos cinco grupos estudados, foi o sorteio simples realizado imediatamente antes dos experimentos.

Os dados foram expressos em uma planilha Excel (*Microsoft for Mac* 2004, versão 11.4.1) em média  $\pm$  desvio padrão (DP), para todas as variáveis numéricas contínuas. Em seguida foram aplicados os testes estatísticos utilizando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 16.0.1 for Windows).

Primeiramente foram aplicados os testes de normalidade, Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-wilk, para definir a frequência de distribuição das variáveis. A evidência de regeneração macroscópica foi classificada como variável categórica binária nominal e o grau de infiltrado inflamatório como variável categórica ordinal. As quantidades de fibras de colágeno, fibras reticulares e celularidade nos ramos comunicantes foram classificadas como variáveis numéricas contínuas com distribuição simétrica.

A comparação entre os diversos grupos foi feita através de análise de variância com um fator para as variáveis numéricas, complementada com o teste de Bonferroni, quando as variâncias foram homogêneas, e com o teste de Dunnett's T3, quando as variâncias não foram homogêneas. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste de qui-quadrado.

Para comparar os ramos comunicantes brancos e cinzentos dentro do mesmo grupo e a mesma variável entre dois grupos foi utilizado o teste t independente para as variáveis numéricas contínuas e o teste de qui-quadrado para as variáveis categóricas.

O grau de correlação entre as variáveis com distribuição normal foi avaliado pelo coeficiente de Pearson e para a variável categórica ordinal com distribuição assimétrica foi utilizado o teste de Spearman.

Na determinação dos valores de  $p$ , foi assumida uma distribuição bicaudal, para as variáveis numéricas, e unicaudal para as variáveis categóricas, por considerar que o efeito da intervenção sobre a reação inflamatória e regeneração macroscópica, produziria apenas um sentido de evolução sobre essas variáveis. O intervalo de confiança adotado foi de 95%, com nível de significância de  $\alpha=0,05$ .

## **RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

A forma de extração dos blocos e dissecação dos segmentos do tronco simpático, com a utilização de lupa óptica, permitiu avaliar a presença de regeneração macroscópica dos ramos comunicantes, comparando o segmento operado aos segmentos intactos adjacentes. Em cinco animais, dois no grupo de 15 DPO, dois no grupo de 45 DPO e um no grupo de 135 DPO, não foi possível uma avaliação macroscópica adequada em um dos lados operados, devido à fragilidade dos tecidos nos grupos de 15 DPO e 45 DPO e a um grande espessamento pleural no caso do grupo de 135 DPO, diminuindo o número total de ramicotomias para esta variável de 56 para n=51. A insistência nessa poderia lesar os ramos e prejudicar a subsequente avaliação microscópica. Dessa forma optou-se por atribuir-lhes ausência de regeneração macroscópica. Não foi pesquisada a presença independente de cada ramo comunicante, mas qualquer estrutura, semelhante a eles, conectando a região do gânglio aos tecidos inferiormente.

A distribuição da frequência de regeneração macroscópica (Tabela 1) mostrou um discreto aumento ao longo tempo, mas apenas o grupo de 180 dias de pós-operatório apresentou significância estatística.

Após a intervenção, houve um aumento similar na porcentagem de área dos ramos comunicantes brancos e cinzentos preenchidas por fibras de colágeno, contudo o aumento foi súbito e significativo a partir de 135 dias de pós-operatório, quando comparado com o grupo controle, conforme demonstrado na figura 20.



Tabela 1 – Distribuição da frequência de regeneração macroscópica nos grupos. Valores expressos em número de casos.

REG. MACROSCÓPICA	GRUPOS					
	15DPO	45DPO	90DPO	135DPO	180DPO	Total
Sem regeneração	6 (11,8%)	7 (13,7%)	8 (15,7%)	7 (13,7%)	7 (13,7%)	35 (68,6%)
Com regeneração	0	3 (5,9%)	4 (7,8%)	4 (7,9%)	5 (9,8%) <sup>1</sup>	16 (31,4%)
Total de ramicotomias	6 (11,8%)	10 (19,6%)	12 (23,5%)	11 (21,6%)	12 (23,5%)	51 (100%)

NOTA: O total de ramicotomias examinadas foi o dobro do total de casos (n=28), pois a cirurgia foi bilateral, menos os casos não examinados macroscopicamente (cinco casos).

<sup>1</sup> p < 0,05.

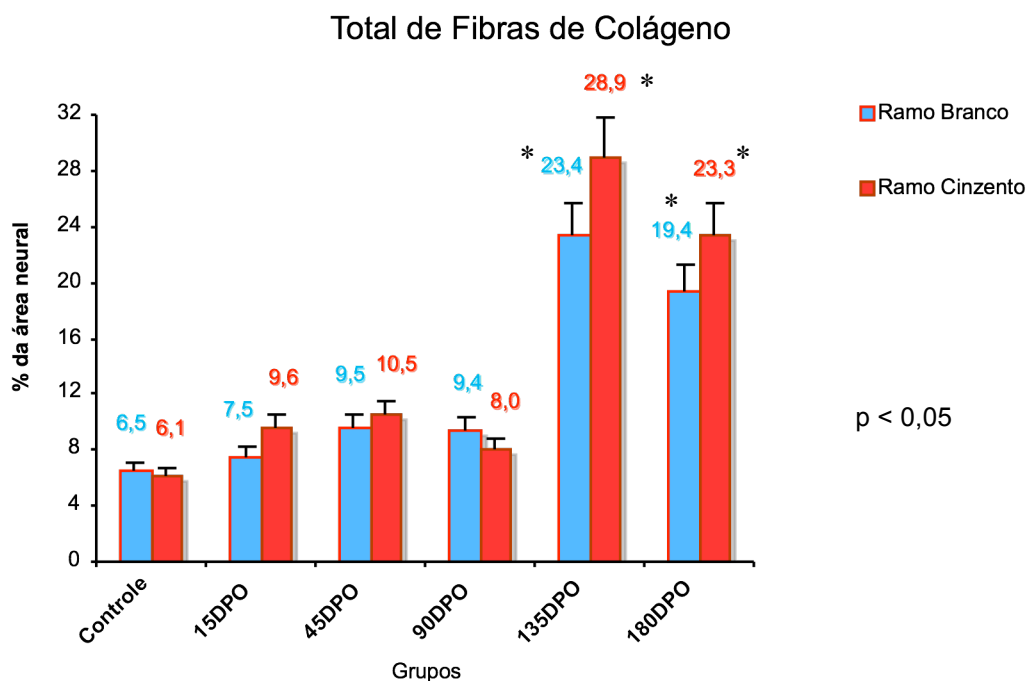


Figura 20 – Comparação entre as fibras de colágeno totais nos ramos comunicantes brancos e cinzentos nos grupos. Valores expressos em média ± EP.

As fibras de colágeno também foram analisadas separadamente como fibras grossas de colágeno e finas, conforme explicado no item 4.7.6.

A figura 21 demonstra que, após 45 dias da ramicotomia, os ramos comunicantes brancos possuem uma porcentagem de área neural recoberta por fibras grossas de colágeno significativamente maior do que os ramos cinzentos. Inversamente, após 135 dias de pós-operatório, os ramos cinzentos apresentam maior número dessas fibras do que os brancos.

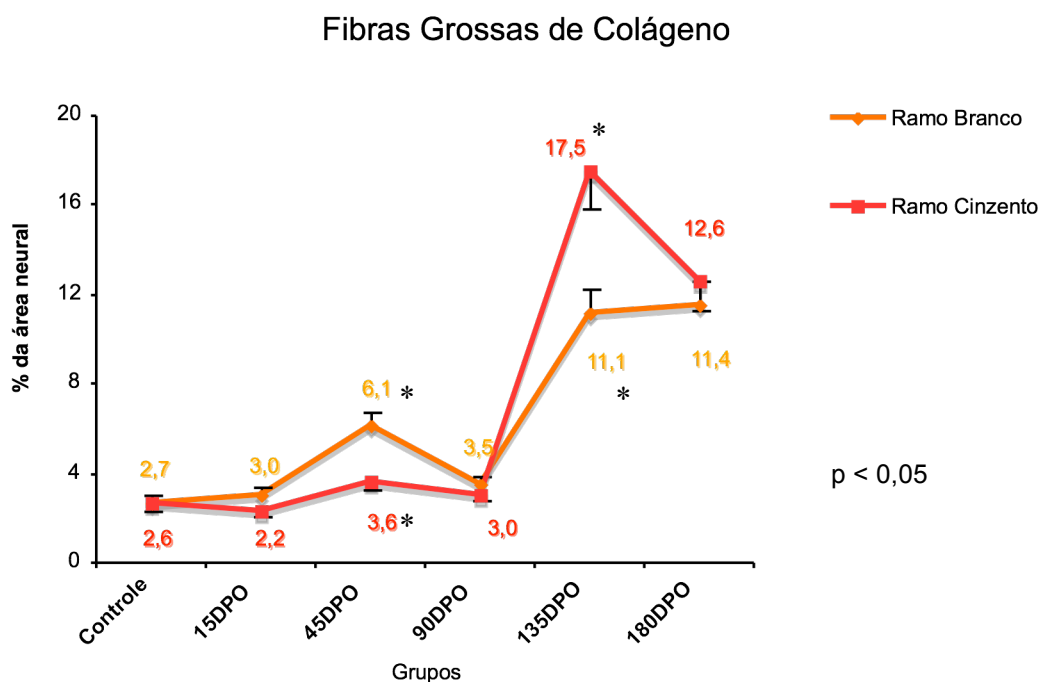


Figura 21 – Comparação entre as fibras grossas de colágeno nos ramos comunicantes brancos e cinzentos. Valores expressos em média  $\pm$  EP.

As fibras finas de colágeno, inversamente às fibras grossas, apresentaram maior intensidade de deposição nos ramos comunicantes cinzentos, após 15 e 45 dias da ramicotomia, do que nos ramos brancos (Figura 22).

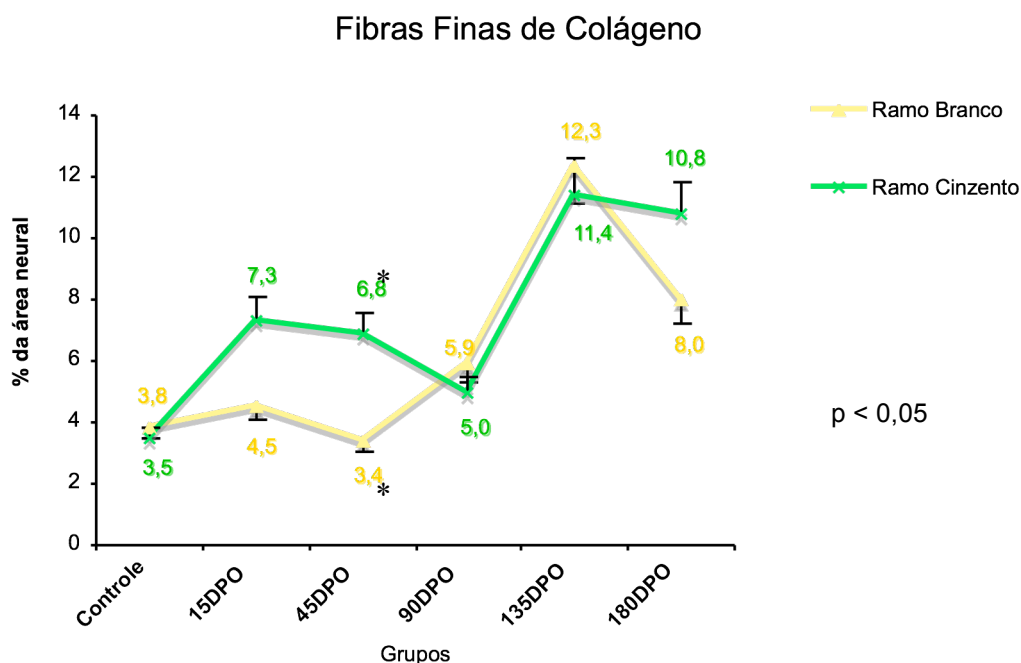


Figura 22 – Comparação entre as fibras finas de colágeno nos ramos comunicantes brancos e cinzentos. Valores expressos em média ± EP.

A figura 23 mostra uma queda importante na quantidade de fibras reticulares até 45 dias após a ramicotomia, quando comparado com o grupo controle, a partir de 90 dias de pós-operatório existe uma nova deposição das fibras reticulares, evidenciados pelo preenchimento de maior porcentagem de área neural, com tendência de valores mais elevados para os ramos comunicantes brancos.

Ao comparar as fibras reticulares com o total de fibras de colágeno, tanto nos ramos comunicantes brancos (Figura 24) quanto nos cinzentos (Figura 25), verificou-se diferença significativa em todos os grupos ( $p < 0,01$ ), associado a uma moderada correlação linear negativa ( $r = -0,408$  e  $r = -0,414$ , respectivamente), demonstrando que uma maior reconstituição da quantidade de fibras reticulares implica em menor deposição de fibras de colágeno e conseqüentemente menor cicatrização.

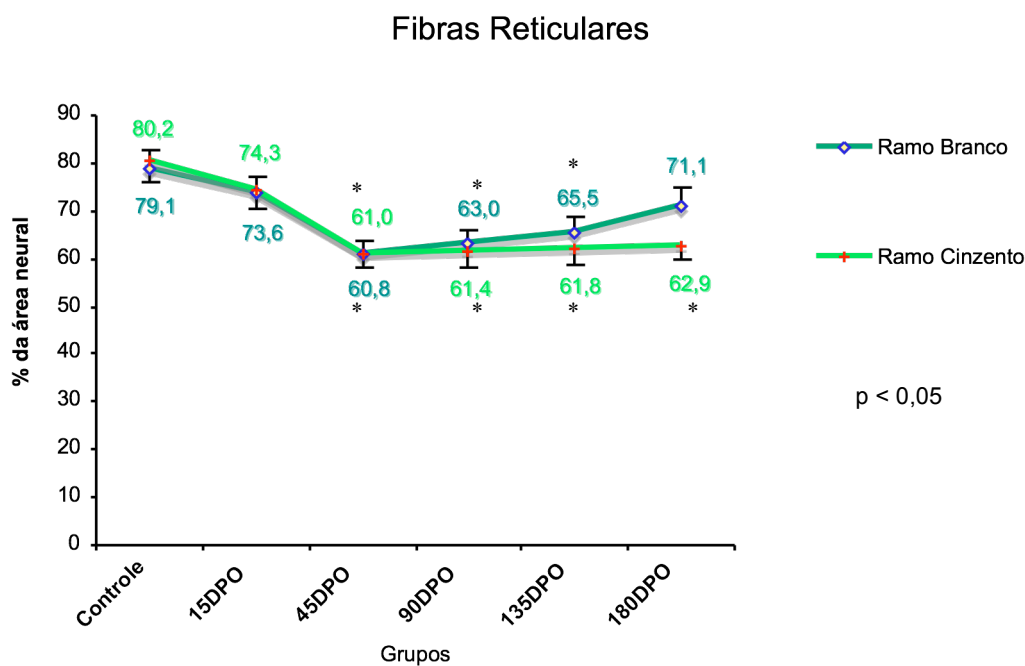


Figura 23 – Comparação entre fibras reticulares nos ramos comunicantes brancos e cinzentos. Valores expressos em média  $\pm$  EP.

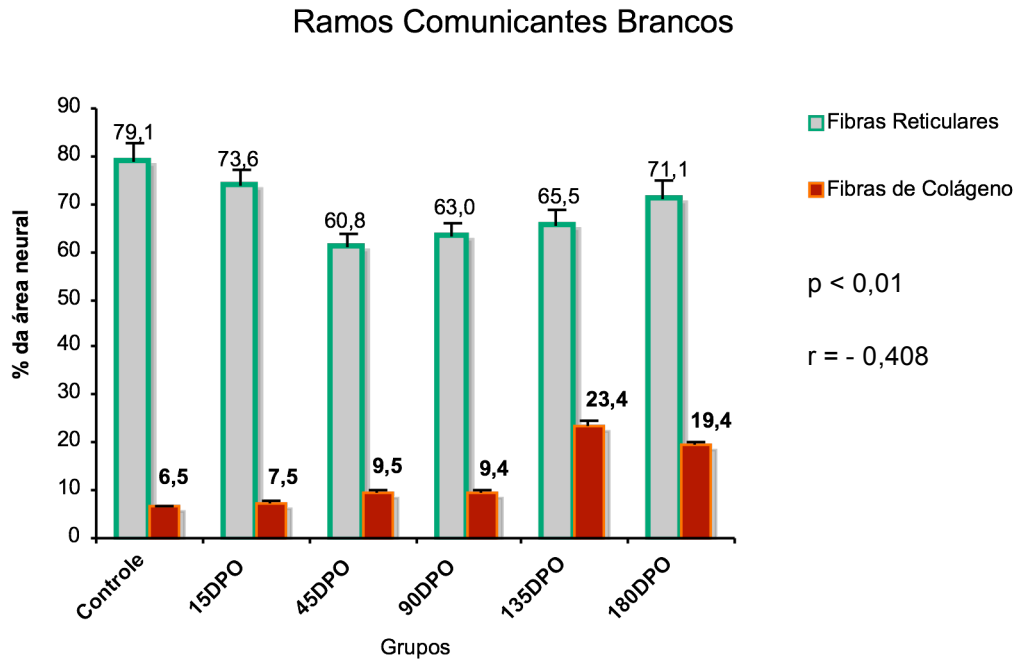


Figura 24 – Comparação entre o total de fibras de colágeno e fibras reticulares nos diversos grupos. Valores expressos em média  $\pm$  EP.

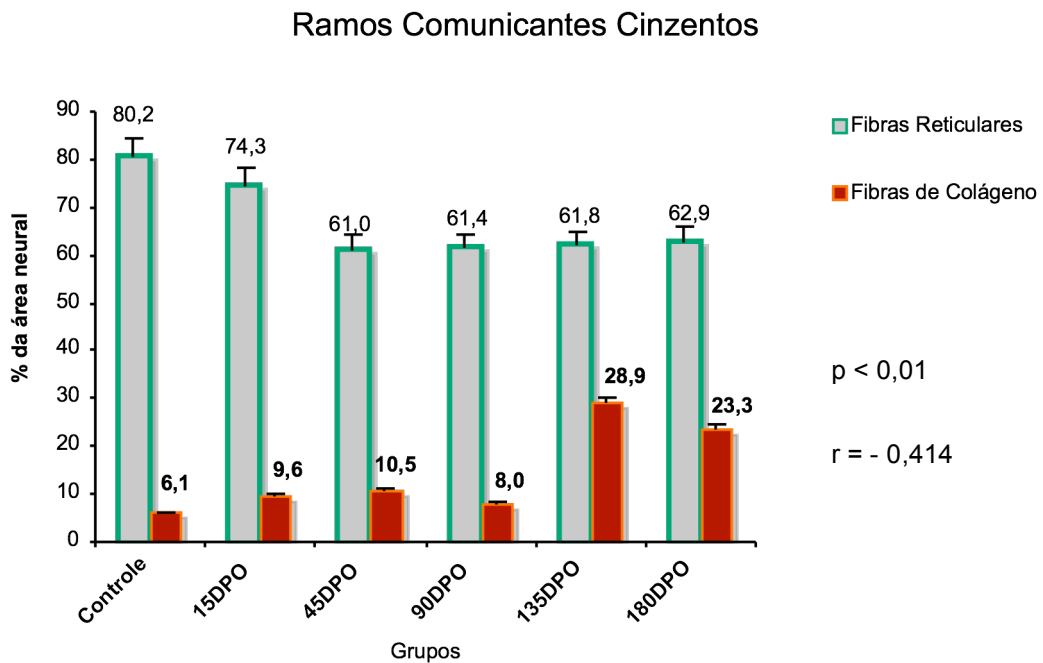


Figura 25 – Comparação entre o total de fibras de colágeno e fibras reticulares nos diversos grupos. Valores expressos em média  $\pm$  EP

A figura 26 demonstra que a ramicotomia tem efeitos distintos sobre o número de células de Schwann nos ramos comunicantes, com tendências de aumento nos ramos brancos e de redução nos cinzentos.

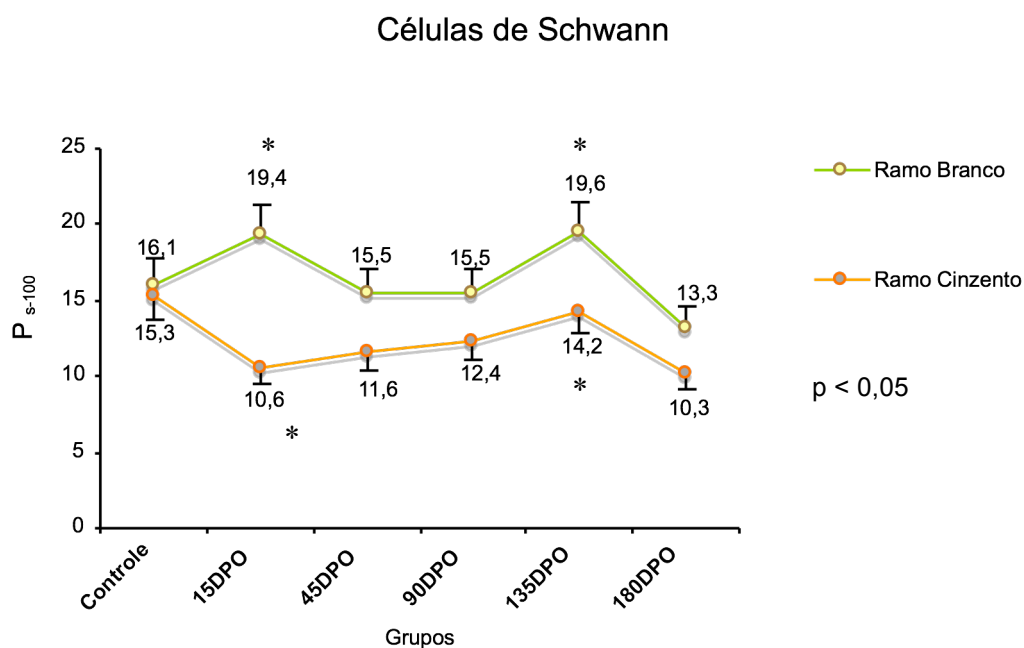


Figura 26 – Comparação entre as células de Schwann nos ramos comunicantes brancos e cinzentos. Valores expressos em média  $\pm$  EP.

A distribuição da frequência encontrada e a classificação semi-quantitativa do infiltrado inflamatório estão expostas na Tabela 2. A reação inflamatória foi intensa no grupo controle de 15 DPO, mas apresentou diminuição progressiva e significativa em todos os grupos estudados ( $p < 0,01$ ).

Tabela 2 – Distribuição da freqüência encontrada de reação inflamatória nos diversos grupos, valores expressos em número de casos.

REAÇÃO INFLAMATÓRIA	GRUPOS					
	15DPO	45DPO	90DPO	135DPO	180DPO	Total
Sem infiltrado inflamatório	1 (1,8%)	5 (8,9%)	4 (7,1%)	7 (12,5%)	10 (17,8%)	27 (48,2%)
Infiltrado inflamatório leve	0	0	4 (7,1%)	4 (7,1%)	2 (3,6%)	10 (17,8%)
Infiltrado inflamatório moderado	1 (1,8%)	4 (7,1%)	3 (5,4%)	0	0	8 (14,4%)
Infiltrado inflamatório severo	6 (10,8%)	3 (5,4%)	1 (1,8%)	1 (1,8%)	0	11 (19,6%)
Total de ramicotomias	8 (14,4%)	12 (21,4%)	12 (21,4%)	12 (21,4%)	12 (21,4%)	56 (100%)

NOTA: O total de ramicotomias foi o dobro do número de casos (n=28) por tratar-se de cirurgia bilateral.

**DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**



## **6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

A simpaticotomia seletiva, ou ramicotomia, é o procedimento cirúrgico menos agressivo utilizado no tratamento da hiperidrose primária, pois mantém intactas as vias ao longo da cadeia simpática e com efetiva redução na frequência e intensidade do suor reflexo<sup>5, 28, 29</sup>. Contudo, a alta taxa de recidiva dos sintomas simpáticos provocou o abandono dessa técnica. O retorno dos sintomas foi atribuído principalmente à secção incompleta dos ramos comunicantes, ou ao desenvolvimento de outras vias de condução para o impulso nervoso<sup>4, 6, 30-33</sup>.

Alguns pesquisadores comprovaram a existência de restauração de tecido do sistema nervoso periférico, tanto motor quanto autônomo, que pode ser por cicatrização, substituição do tecido nervoso por fibras de colágeno, ou regeneração. Também definiram parâmetros importantes que favorecem a regeneração neural, como a proximidade dos cotos axonais seccionados e o tempo gasto na reaproximação destes após a lesão<sup>34-36</sup>.

O modelo experimental criado tentou reproduzir o procedimento cirúrgico adotado em humanos. A definição dos períodos de sacrifício para a análise histológica permitiu avaliar o aspecto temporal após a secção dos ramos comunicantes, desde a degeneração Walleriana, na avaliação precoce do grupo 15 DPO, até a estabilidade do processo regenerativo ou cicatricial, no grupo 180 DPO<sup>35, 36, 83</sup>.

O primeiro dado coletado para estudo comparativo entre os grupos foi a regeneração macroscópica dos ramos comunicantes. Essa avaliação,

durante os procedimentos de re-simpatectomia em humanos é descrita de forma bastante subjetiva, sendo a recidiva dos sintomas atribuída frequentemente à ressecção incompleta, sem a devida comprovação histológica<sup>84, 85</sup>. O único trabalho encontrado na literatura que associa a recidiva da hiperidrose após simpatectomia com a regeneração histológica em humanos foi publicado por Singh em 1998, ele ressecou o segmento neural seccionado na primeira cirurgia e conseguiu comprovar histologicamente que o segmento havia se regenerado<sup>86</sup>. No presente estudo não houve regeneração macroscópica no grupo 15DPO, já no grupo 45 DPO foi encontrada em 30% dos casos (3 regenerações em 10 ramicotomias estudadas), com elevação progressiva ao longo do período estudado até atingir 41,6% (5 regenerações em 12 ramicotomias) no grupo 180 DPO (qui-quadrado,  $p < 0,05$ ). O aumento da regeneração macroscópica ocorreu em paralelo com uma diminuição progressiva do grau de inflamação nesses grupos, sugerindo uma estabilização do processo degenerativo e regenerativo a partir do grupo 135 DPO. Fawcett, em 1990, através de microscopia eletrônica e reações de imuno-histoquímica demonstrou que o processo de regeneração neural no pericário e coto proximal é precoce, podendo iniciar-se poucas horas após a lesão. Já nas proximidades da secção e no coto axonal distal o processo de degeneração pode se prolongar por semanas antes que exista alguma regeneração<sup>35</sup>. Isso pode explicar a inexistência de regeneração no grupo 15 DPO, principalmente face ao elevado grau de inflamação encontrado neste grupo (conforme

demonstrado na tabela 2) sugerindo assim um processo de degeneração Walleriana ainda em desenvolvimento.

No presente estudo a regeneração macroscópica de 30-40% não reflete a taxa de recidiva dos sintomas simpáticos após procedimentos de ramicotomia descritas em humanos, que é aproximadamente 20%<sup>28, 87, 88</sup>. Essa diferença pode ser devida aos seguintes fatores: (i) A regeneração anatômica não implica em regeneração funcional, para que haja regeneração funcional é necessária a reconexão apropriada do neurônio, ou seja, os feixes de axônios regenerados devem coincidir com os feixes que inervam as glândulas sudoríparas para o dermatomo acometido pelos sintomas da hiperidrose, caso contrário, existirá uma regeneração histológica não funcional<sup>34, 36, 75</sup>. (ii) A regeneração pode ocorrer em apenas um dos ramos comunicantes, pré ou pós-ganglionar, e dependendo do gânglio operado na hiperidrose palmar ou axilar, um ramo pode não ser suficiente para a recidiva dos sintomas. (iii) A avaliação da regeneração macroscópica é subjetiva e pode gerar erros em sua interpretação, por exemplo falhas na identificação dos ramos comunicantes, ou a interpretação de um ramo fibrosado como um ramo regenerado.

A principal hipótese que justificaria a recidiva após a ramicotomia nos humanos, que é a de secção incompleta dos ramos comunicantes<sup>28, 66, 87</sup>. No presente estudo, durante a preparação das lâminas, os cortes histológicos foram padronizados de maneira a envolver integralmente a região do gânglio simpático, o que nos possibilitou verificar a eficácia do procedimento cirúrgico na secção de todos os ramos brancos e cinzentos,

pré e pós-ganglionares. Através dessa análise verificamos que todos os ramos apresentavam algum grau de manipulação, com deposição de fibras de colágeno e diminuição de fibras reticulares, quando comparados aos ramos comunicantes do grupo controle.

A possibilidade da regeneração ou cicatrização neural evoluírem de formas diferentes nos segmentos axonais pré e pós-secção justificou a necessidade de separação e identificação dos ramos pré e pós-ganglionares, procedimento realizado com a coloração de Weil. No presente estudo a secção dos ramos comunicantes foi realizada no mesmo nível, bem próximo ao gânglio simpático. Assim os ramos pré-ganglionares nos cortes histológicos devem corresponder aos segmentos pós-secção e, portanto, sofrem degeneração completa (Figura 9B). Já os ramos pós-ganglionares correspondem aos segmentos pré-secção, onde a evolução da degeneração é interrompida no primeiro nóculo de Ranvier mais próximo da injúria <sup>34, 36, 68, 89</sup>.

O principal parâmetro estudado relacionado à cicatrização foi a deposição de fibras de colágeno. Elas apresentaram pico de deposição no grupo 135 DPO com diminuição acentuada no grupo 180 DPO, o que pode ser atribuído ao remodelamento cicatricial característico da fase crônica do processo de reparação das lesões teciduais <sup>90, 91</sup>. Nos dois últimos grupos, 135 DPO e 180 DPO, a quantidade de fibras de colágeno depositadas nos ramos comunicantes cinzentos foi significativamente maior do que nos ramos brancos, esse dado sugere maior grau de cicatrização nos ramos cinzentos.

O colágeno tipo I é o mais abundante no interstício da maioria dos tecidos e o principal responsável do processo de cicatrização. Embora não seja possível definir exatamente o tipo de colágeno através da coloração de picrossírius, sabe-se que o colágeno tipo I apresenta-se principalmente como fibras grossas na luz polarizada, dessa forma a maior concentração dessas fibras nos ramos comunicantes cinzentos indica maior processo cicatricial<sup>92-98</sup>.

Ao avaliar separadamente as fibras grossas e finas de colágeno, de forma independente nos dois ramos, verificou-se que as fibras grossas aparecem em menores níveis nos ramos pós-ganglionares durante o primeiro trimestre (15 DPO, 45 DPO e 90 DPO) e, de forma inversa, atingem níveis superiores aos ramos pré-ganglionares durante o segundo trimestre do procedimento (135 DPO e 180 DPO). Reciprocamente, as fibras finas aparecem em níveis mais elevados nos ramos pós-ganglionares no primeiro trimestre, sendo que no segundo trimestre não há mais diferença.

As fibras reticulares, compostas principalmente por colágeno tipo III e de 6 a 12% de açúcares, coradas pela coloração de reticulina de Gomori, constituem parte importante do envoltório conjuntivo do endoneuro<sup>94, 99</sup>. Assim sua manutenção ou restauração, após a secção do nervo, deve estar relacionada à sua regeneração. No presente estudo as fibras reticulares apresentaram um declínio acentuado após a ramicotomia até o grupo 45 DPO, o que sugere absorção de parte do endoneuro no período inicial da degeneração Walleriana. A partir daí as fibras reticulares passaram a apresentar uma elevação discreta e contínua até o grupo 180 DPO,

coincidindo com os achados da regeneração macroscópica. Esta elevação das fibras reticulares entre os grupos 45 DPO e 180 DPO foi menos marcante para os ramos comunicantes cinzentos, o que sugere um menor grau de regeneração dos mesmos.

A participação das fibras de colágeno e reticulares no processo regenerativo pode ser visualizada nas figuras 24 e 25. Ao utilizarmos o coeficiente de correlação linear de Pearson verificamos uma correlação negativa entre elas ( $r = - 0,408$  e  $r = - 0,414$ , respectivamente;  $p < 0,01$ ). A fibra de colágeno é o principal componente na formação do processo cicatricial<sup>92, 94-98</sup>, já a fibra reticular forma uma fina e delicada rede de fibrilas sob a membrana basal das células de Schwann, fornecendo um arranjo de sustentação celular preservando espaço para o movimento molecular dos fluidos extracelulares no endoneuro<sup>100-104</sup>. Considerando suas funções distintas, a correlação negativa entre as fibras colágenas e reticulares sugere que os ramos nos quais há maior quantidade de fibras reticulares, e menor de fibras colágenas, teriam maiores possibilidades de regeneração.

As células de Schwann participam ativamente na degeneração Walleriana, ajudando os macrófagos a reabsorverem a mielina, bem como são essenciais na regeneração do coto distal do axônio, multiplicando-se e formando as bandas de Büngner<sup>36, 73, 77, 78</sup>. No grupo controle, a quantidade de células de Schwann nos ramos comunicantes foi similar nas fibras ricas em mielina (ramos brancos) e nas fibras pobres em mielina (ramos cinzentos). Em contraste, houve elevação significativa no número dessas

células nos ramos brancos do grupo 15 DPO, onde também ocorreu a reação inflamatória mais intensa. Já nos ramos cinzentos desse grupo verificou-se o contrário, ou seja, uma queda significativa no número de células de Schwann quando comparado ao ramo branco. Com a diminuição da reação inflamatória nos grupos 45 DPO a 180 DPO, ocorreu um aumento progressivo no número das células de Schwann no ramo cinzento, contudo sempre mantendo níveis inferiores aos ramos brancos. Esse menor número de células de Schwann encontrado nos ramos cinzentos permite algumas especulações: (i) Os níveis mais elevados de fibras de colágeno e os menores níveis de fibras reticulares nos ramos cinzentos são sugestivos de menor regeneração, o que pode justificar o menor número de células de Schwann nessas fibras; (ii) Como as fibras dos ramos cinzentos são pós-ganglionares, dependendo do nível de corte selecionado, existe uma maior possibilidade de se estudar o segmento pré-secção nos ramos comunicantes cinzentos, onde as alterações histológicas causadas pela lesão, presumivelmente, ocorrem de forma mais branda, conforme demonstrado na figura 9B; (iii) A ação fagocitária dos macrófagos pode ter sido menor nos ramos cinzentos devido à ausência de mielina nas fibras cinzentas e, conseqüentemente, a ativação das células de Schwann no início do processo de degeneração<sup>35, 36, 73, 77</sup>.

O modelo experimental utilizado não permite determinar se os segmentos dos ramos comunicantes selecionados para estudo pertencem ao segmento pré ou pós-secção, nem se a quantidade de fibras colágenas e reticulares depositadas durante o processo de cicatrização, ou regeneração,

seria suficiente para permitir alguma função nos ramos comunicantes regenerados. Mas a julgar pelos elementos estritamente histológicos nossos dados indicam que a regeneração dos ramos comunicantes após o procedimento de ramicotomia ocorre numa freqüência maior que a recidiva clínica reportada em humanos. Isso sugere que o retorno dos sintomas simpáticos seja atribuído mais à regeneração do que à secção incompleta dos ramos.

Assumindo que a regeneração simpática é o principal fator subjacente da recidiva dos sintomas após a ramicotomia nos humanos, é possível desenvolver estratégias para evitá-la, como por exemplo, a utilização de barreiras físicas entre o tronco simpático e os ramos comunicantes após a ramicotomia. Um fragmento de pericárdio bovino ou politetrafluoretileno (PTFE), por exemplo, pode bloquear a reconexão dos cotos proximal e distal. Pode-se também tentar utilizar o bloqueio simpático com clipe metálico nos ramos comunicantes, ao invés de seccioná-los, o que poderia bloquear o impulso nervoso, sem desencadear o processo de degeneração e regeneração Walleriana.



**CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

O modelo experimental em suínos para o estudo da cadeia simpática é confiável e permite reproduzir os procedimentos cirúrgicos realizados nos humanos.

A secção de todos os ramos comunicantes dos gânglios simpáticos operados foi completa, indicando que a ramicotomia é eficaz no bloqueio do estímulo central.

Até o grupo 15 DPO a reação inflamatória é intensa e não há regeneração neural. A regeneração macroscópica surge a partir do grupo 45 DPO, elevando-se progressivamente até atingir 41,6% dos casos no grupo 180 DPO.

O processo de cicatrização estabiliza-se após o grupo 135 DPO.

A presença das células de Schwann é maior nos ramos pré-ganglionares.

Ao longo do período estudado os ramos cinzentos apresentaram maior quantidade de fibras colágenas e menor de fibras reticulares do que os ramos brancos.

O processo regenerativo se desenvolve de forma similar em ambos os ramos comunicantes, brancos e cinzentos, contudo há menor tendência de regeneração nos ramos cinzentos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS**

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amir M, Arish A, Weinstein Y, Pfeffer M, Levy Y. Impairment in quality of life among patients seeking surgery for hyperhidrosis (excessive sweating): preliminary results. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 2000; 37(1): 25-31.
2. Lerer B, Jacobowitz J, Wahaba A. Personality features in essential hyperhidrosis. *Int J Psychiatry Med* 1981; 10:59-67.
3. Freund U. Endoscopic transthoracic sympathectomy in the treatment of primary hyperhidrosis. A review of 290 sympathectomies. *Arch Surg*. 1994 Mar; 129(3):241-4.
4. Gossot D et al. Long-term results of endoscopic thoracic sympathectomy for upper limb hyperhidrosis. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:1075-1079.
5. Gossot D. Selective endoscopic sympathectomy for palmar hyperhidrosis. *Presse Med*. 1995 Dec 2; 24(37):1739-42.
6. Gossot D. Thoracoscopic sympathectomy for upper limb hyperhidrosis: looking for the right operation. *Ann Thorac Surg*. 1997 Oct; 64(4):975-8.
7. Mack MJ et al. Thoracoscopic sympathectomy for hyperhidrosis: indications and results. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:410-414.
8. Hashmonai M, Kopelman D. History of Sympathetic Surgery. *Clin Auton Res*. 2003 Dec; 13 Suppl 1:16-9.

9. Kotzareff A. Résection partielle du tronc sympathique cervical droit pour hyperhidrose unilatérale (région faciale, cervicale, thoracique et brachiale droite). *Rev Med Suisse Rom* 1920; 40:111-113.
10. Munia MA, Wolosker N, Kauffman P, de Campos JK, Puech-Leao P. A randomized trial of T3-T4 versus T4 sympathectomy for isolated axillary hyperhidrosis. *J Vasc Surg* 2007; 45(1):130-3.
11. Yang J, Tan JJ, Ye GL, Gu WQ, Wang J, Liu YG. T3/T4 thoracic sympathectomy and compensatory sweating in treatment of palmar hyperhidrosis. *Chin Med J* 2007; 120(18):1574-7.
12. Kwong KF, Hobbs JL, Cooper LB, Burrows W, Gamliel Z, Krasna MJ. Stratified analysis of clinical outcomes in thoracoscopic sympathectomy for hyperhidrosis. *Ann Thoracic Surg* 2008; 85:390-4.
13. De Campos JRM, Kauffman P, Werebe EC, Filho LOA, Kusniek S, Wolosker N, Jatene FB. Quality of life, before and after thoracic sympathectomy: report on 378 operated patients. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:886-891.
14. Lin CC, Talaranta T. Lin-Talaranta classification: the importance of different procedures for different indications in sympathetic surgery. *Ann Chir Gyn* 2001; 90:161-6.
15. Chou SH, Kao EL, Lin CC, Chang YT, Huang MF. The importance of classification in sympathetic surgery and a proposed mechanism for

- compensatory hyperhidrosis: experience with 464 cases. *Surg Endosc* 2006; 20:1749-1753.
16. Inbar O, Leviel D, Shwartz I, Paran H, Whipp BJ. Thoracic sympathectomy and cardiopulmonary responses to exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2008; 104:79-86.
  17. Ben-Dov I, Chorney N, Gaides M, Shachor D. Effect of thoracic sympathectomy on arm and leg exercise capacity and on lung function. *Respiration*. 2000; 7:378-382.
  18. Nakamura Y, Fujimoto M, Nagata Y, Shiraishi K, Yoshizawa H, Kida H et al. Effects of endoscopic transthoracic sympathicotomy on hemodynamic and neurohumoral responses to exercise in humans. *Circ J*. 2002; 66:357-361.
  19. Loewy AD, Spyer KM. Central regulation of autonomic functions. Oxford University Press, New York, 1990: pp. 88-103.
  20. Ogawa T. Thermal influence on palmar sweating and mental influence on generalized sweating in man. *Jpn J Physiol* 1975; 25:525-536.
  21. Vetrugno R, Liguori R, Cortelli P, Montagna P. Sympathetic skin response: basic mechanisms and clinical applications. *Clin Auton Res*. 2003; 13:256-270.
  22. Moran KT, Brady MP. Surgical management of primary hyperhidrosis. *Br J Surg* 1991; 78:279-83.

23. O’Riordain DS, Maher M, Waldron DJ, O’Donovan B, Brady MP. Limiting the anatomic extent of upper thoracic sympathectomy for primary palmar hyperhidrosis. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176:151-4.
24. Assalia A, Bahouth H, Ilivitzki A, Assi Z, Hashmonai M, Krausz MM. Thoracoscopic sympathectomy for primary palmar hyperhidrosis: resection versus transection – a prospective trial. *World J Surg* 2007; 31:1976-9.
25. Krasna MK. Thoracoscopic Sympathectomy: a standardized approach to therapy for hyperhidrosis. *Ann Thorac Surg* 2008; 85:S764-7.
26. Moon SW, Jo KH, Sa YJ, Park JK, Lee SH, Wang YP. 6th International Symposium on Sympathetic Surgery (ISSS) 4th–6th May 2005 University Campus Vienna Austria. *Clin Auton Res* 2005; 15:130-145.
27. De Lima NFF, Carvalho ALA. 7th International Symposium on Sympathetic Surgery 20th--22nd March 2007 Muro Alto (PE), Brazil. *Clin Auton Res* 2007; 17:126-144.
28. Cho HM, Chung KY, Kim DJ, Lee KJ, Kim KD. The comparison of VATS ramicotomy and VATS sympathicotomy for treating essential hyperhidrosis. *Yonsei Med J.* 2003 Dec 30; 44(6):1008-13.
29. Wittmoser R. Thoracoscopic sympathectomy and vagotomy. In: Cuschieri A, Buess G, Perissat J, eds. *Operative manual of endoscopic surgery*. New York: Springer, 1992:110-33.

30. Lin TS. Video-assisted thoracoscopic “resympathicotomy” for palmar hyperhidrosis: analysis of 42 cases. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:895-8.
31. Lee DY, Kim DH, Paik HC. Selective division of T3 rami communicants (T3 ramicotomy) in the treatment of palmar hyperhidrosis. *Ann Thoracic Surg* 2004; 78:1052-5.
32. Lee DY, Paik HC, Kim DH, Kim HW. Comparative analysis of T3 selective division of rami communicants (ramicotomy) to T3 sympathetic clipping in treatment of palmar hyperhidrosis. *Clin Auton Res* 2003; 13(S1):I45-47.
33. Kim DH, Paik HC, Lee DY. Comparative analysis of T2 selective division of rami-communicants (ramicotomy) with T2 sympathetic clipping in the treatment of craniofacial hyperhidrosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 26:396-400.
34. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 1996; 76:319-370.
35. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13:43-60.
36. Guth L. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. *Physiol Rev* 1956; 36:441-478.
37. Royle JP. A history of sympathectomy. *Aust N Z J Surg* 1999; 69(4):302-307.



38. Gray H. The sympathetic nerves. In: Lewis WH (ed) *Anatomy of the Human Body*. 20th Ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 2000:1292-1309.
39. Yitzhak Schiller. The anatomy and physiology of the sympathetic innervation to the upper limbs. *Clin Auton Res*. 2003 Dec; 13 Suppl 1:12-5.
40. Kauffman P. Simpatectomias. In: Raia AA, Zerbini EJ, Eds. *Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto*. 4a edição. São Paulo, Sarvier, 1994:84-101.
41. Yip JW, Yip YPL, Capriotti C. Specific projections of sympathetic preganglionic neurons are not intrinsically determined by segmental origins of their cell bodies. *J Neurobiol* 1998; 35:371-378.
42. Hoffman BB, Taylor P. Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: Hardman JG, Limbird LE (eds) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th Ed. McGraw-Hill, New York, 2001:115-154.
43. Bernard C. Sur les effets de la section de la portion céphalique du grand sympathique. *Comptes Rend Soc Biol*, 1852; 4:168-170.
44. Brown-Séquard CE. Experimental researches applied to physiology and pathology. *Medical Examiner*, Philadelphia 1852; 8:481, 490, 549, 617, 698.
45. Gruber CM. The threshold stimulus of the cervical sympathetic in relation to vasodilatation, vasoconstriction and salivary secretion. *Am J Physiol* 1915; 37:259-266.

46. Clark C. Sweating and hyperhidrosis. *Pharmacol J* 2006 June24; 276:757-60.
47. Selley WB, Florence R. Compensatory hyperhidrosis of sympathectomy. *N Engl J Med* 1960; 263:1056-8.
48. Moya J, Ramos R; Vives N; Pérez J; Morera R; Perna V et al. Compensatory sweating after upper thoracic sympathectomy. Prospective study of 123 cases. *Arch Broncopneumol* 2004; 40(8):360-363.
49. Smithwick RH. Surgical intervention on the sympathetic nervous system for peripheral vascular disease. *Arch Surg* 1940; 40:286-306.
50. Amir M, Arish A, Weinstein Y, et al. Impairment in quality of life among patients seeking surgery for hyperhidrosis (excessive sweating). Preliminary results. *Isr Psychiatry Relat Sci* 2000; 37:25-31
51. Yazbek G, Wolosker N, de Campos JR, Kauffman P, Ishy A, Puech-Leao P. Palmar hyperhidrosis-which is the best level of denervation using video-assisted thoracoscopic sympathectomy: T2 or T3 ganglion? *J Vasc Surg* 2005; 42:281-285.
52. Neumayer C, Zacherl J, Holak G, Függer R, Jakesz R, Herbst F, Bischof G. Limited endoscopic thoracic sympathetic block for hyperhidrosis of the upper limb. *Surg Endosc* 2004; 18:15-156.

53. Licht PB, Jorgensen OD, Ladegaard L, Pilegaard HK. Thoracoscopic sympathectomy for axillary hyperhidrosis: the influence of T4. *Ann Thorac Surg* 2005; 80:455-60.
54. Whitson BA, Andrade RS, Dahlberg PS, Maddaus MA. Evolution of clipping for thoracoscopic sympathectomy in symptomatic hyperhidrosis. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2007; 17(4):287-90.
55. Reisfeld R. Sympathectomy for hyperhidrosis: should we place the clamps at T2-T3 or T3-T3? *Clin Auton Res* 2006; 16(6):384-389.
56. Sciuchetti JF, Corti F, Ballabio D, Angeli MC. Results, side effects and complications after thoracoscopic sympathetic block by clamping. *Clin Auton Res* 2008; 18(2):80-83.
57. Jo KH, Moon SW, Kim YD, Sung B, Cho DG, Jin U, Yoon JS, Wang YP. New protocol for a reversal operation in endoscopic thoracic sympathetic clamping: pulling back the suture sling linked to the clip under local anesthesia. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2007; 17(1):29-32.
58. Shah HC, Eing LK, Chien CL, Meei FH. The outcome of ganglion clipping in hyperhidrosis and blushing. *Clin Auton Res* 2006; 16(3):240-242.
59. Lin TS. Endoscopic clipping in video-assisted thoracoscopic sympathetic blockade for axillary hyperhidrosis. *Surg Endosc* 2001; 15:126-128.
60. Lin CC, Mo LR, Lee LS, Ng SM, Hwang MH. Thoracoscopic T2 block by clipping: a better and reversible operation for the treatment of hyperhidrosis

- palmaris: experience with 326 cases. *Eur J Surg* 1998; 164(Suppl 580):13–6.
61. Lin TS. Video-assisted thoracoscopic T2 sympathetic block by clipping for palmar hyperhidrosis (analysis of 52 cases). *J Laparoendosc Adv Surg Techn* 2001; 11:59-62.
62. Hwang JJ, Paik HC, Lee DY. Comparison of T3 ramicotomy with lateral extension versus T3,4 ramicotomy in palmar hyperhidrosis (P). 6th International Symposium on Sympathetic Surgery (ISSS) 4th–6th May 2005. University Campus Vienna Austria. *Clin Auton Res* 2005; 15:135-136.
63. Kuntz A. Distribution of the sympathetic rami to the brachial plexus: its relation to sympathectomy affecting the upper extremity. *Archives of Surgery* 1927; 15:871-877.
64. Ramsaroop L, Partab P, Singh B, Satyapal KS. Thoracic origin of a sympathetic supply to the upper limb: the 'nerve of Kuntz' revisited. *J Anat* 2001; 199:675-682.
65. Kim DH, Hong YJ, Hwang JJ, Kim KD, Lee DY. Topographical considerations under video-scope guidance in the T3,4 levels sympathetic surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; 33(5):786-9.
66. Cho HM, Lee YD, Sung SW. Anatomical variations of rami communicants in the upper thoracic sympathetic trunk. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27:320-324.

67. Jones EG, Cowan WM. Tecido Nervoso. In: Weiss L. ed. Histologia. 4a ed. Editora Guanabara Koogan SA. 1981: cap 8 237-310.
68. Langley JN: On the regeneration of preganglionic and of postganglionic visceral nerve fibers. J Physiol 1897; 22: 215-30.
69. McLachlan E: The formation of synapses in mammalian sympathetic ganglia reinnervated with preganglionic or somatic nerves. J Physiol 1974; 237: 217-42.
70. Purves D: Competitive and non-competitive re-innervation of mammalian sympathetic neurones by native and foreign fibres. J Physiol 1976; 261: 453-75.
71. Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Plese JPP. Mecanismos básicos de regeneração de nervos. Arq Bras Neurocir. 2005; 24(1):20-5.
72. Bandoğlu E. Guided peripheral nerve regeneration. Biomaterials and tissue engineering research center; 2006.
73. Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. Int. Rev Neurobiol 1971; 14:49-125.
74. Sulaiman WAR, Kline DG. Nerve surgery: a review and insights about its future. Clinical Neurosurgery. 2006; 53:38-47.
75. Goldberg JL. How does an axon grow? Genes & Dev 2003; 17:941-958.

76. Mc Quarrie IG. Effect of a conditioning lesion on axonal sprout formation at nodes of Ranvier. *J Comp Neurol* 1985; 231:239-249.
77. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996 Jun;25(2):101-21.
78. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997 Feb-Apr;14(1-2):67-116.
79. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1985 Mar; 75(3): 384-8.
80. Vaughn CC et al. Tissue response to biomaterials used for staple-line reinforcement in lung resection. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998; 13:259-265.
81. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96:379-394.
82. DeHoff RT, Rhines FN. Quantitative microscopy. New York. McGraw-Hill Book Co. 1968; pp 48-49.
83. Aldini NN, Fini M, Rocca M, Giavaresi G, Giardino R. Guided regeneration with resorbable conduits in experimental peripheral nerve injuries. *Int Orthop* 2000; 24:121-125.
84. Hsu CP, Chen CY, Hsia JY, Shai SE. Resympathectomy for palmar and axillary hyperhidrosis. *Br J Surg* 1998; 85(11):1504-1505.

85. Kim DH, Paik HC, Lee DY. Video assisted thoracoscopic re-sympathetic surgery in the treatment of re-sweating hyperhidrosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27:741-744.
86. Singh B, Moodley J, Haffejee AA, Ramdial PK, Robbs JV, Rajaruthnam P. Resympathectomy for sympathetic regeneration. *Surg Laparosc Endosc* 1998; 8:257-260.
87. Cho HM, Paik HC, Kim DH, Ham SJ, Lee DY. Ramicotomy of T2,3 sympathetic ganglia for palmar hyperhidrosis. *Korean J Thorac Cardio-vasc Surg* 2002; 35:724-729.
88. Gossot D, Toledo L, Fritsch S, Célérier M. Thoracoscopic sympathectomy for upper limb hyperhidrosis: Looking for the right operation. *Ann Thoracic Surg* 1997; 64:975-8.
89. Haimovici H, Hodes R. Preganglionic nerve regeneration in completely sympathectomized cats. *Am J Physiol* 1940; 128:463-466.
90. Bonamigo RR, Peukert C, Berti C. Gelatinases A and B in dermatology. *An Bras Dermatol* 2001; 76(4):463-466.
91. Agren MS. Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol* 1994; 131:634-640.
92. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003; 55:1531-1546.

93. Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen: an overview. *Imp Dent* 2002; 11(3):280-285.
94. Junqueira LCU, Montes GS, Krisztan RM. The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. *Cell Tissue Res* 1979; 202:453-460.
95. Sievert KD, Fandel T, Wefer J, Gleason CA, Nunes L, Dahiya R, Tanagho EA. Collagen I:III ratio in canine heterologous bladder acellular matrix grafts. *World J Urol* 2006;24:101-109.
96. Marí-Beffa M, Santamaría JA, Ruiz-Sánchez J, Santos-Ruiz L, Becerra J. Extracellular matrix in fin regeneration in teleosts. *Braz J Morphol Sci* 2003; 20(2):61-65.
97. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 1989; 93:27-29.
98. Rich L, Whittaker P. Collagen and Picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci* 2005; 22(2):97-104.
99. Buttow NC, Cancino MEC. Histological technique for the visualization of connective tissue, applicable to fundamental and medium school. *Arq Mudi* 2007; 11(2):36-40.



100. Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol* 2002; 65(2):109-126.
101. Ohtani O. Three-dimensional organization of the collagen fibrillar framework of the human and rat livers. *Arch Histol Cytol* 1988; 51:473-488.
102. Ushiki T, Ohtani O, Abe K. Scanning electron microscopic studies of reticular framework in the rat mesenteric lymph node. *Anat Rec* 1995; 241:113-122.
103. Howrad CV, Reed MG, eds. Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy. In: *Microscopy handbooks*, vol. 41. New York: Springer-Verlag & BIOS Scientific Publishers Ltd., 1998.
104. Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, Raspanti M. Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron* 2002; 33:587-596.